



UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

ESTUDO PRELIMINAR DA VARIAÇÃO DOS NÍVEIS DE CORTISOL EM DOENTES DA
ESPÉCIE *CANIS FAMILIARIS* SUJEITOS A MASTECTOMIA POR DOENÇA
ONCOLÓGICA DA MAMA

ANA MARTA LOURINHO ROMANA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Mário António Pereira da Silva
Soares de Pinho
Doutora Maria Teresa da Costa Mendes
Vitor Villa de Brito
Doutor Luís Miguel Alves Carreira

ORIENTADOR

Doutor Josep Arús Martí

CO-ORIENTADOR

Doutor Luís Miguel Alves
Carreira

2016

LISBOA



UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

ESTUDO PRELIMINAR DA VARIAÇÃO DOS NÍVEIS DE CORTISOL EM DOENTES DA
ESPÉCIE *CANIS FAMILIARIS* SUJEITOS A MASTECTOMIA POR DOENÇA
ONCOLÓGICA DA MAMA

ANA MARTA LOURINHO ROMANA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Mário António Pereira da Silva
Soares de Pinho
Doutora Maria Teresa da Costa Mendes
Vitor Villa de Brito
Doutor Luís Miguel Alves Carreira

ORIENTADOR

Doutor Josep Arús Martí

CO-ORIENTADOR

Doutor Luís Miguel Alves
Carreira

2016

LISBOA

À minha Mãe e ao meu eterno cachorro Pongo Aramis

*“All our dreams can come true, if we have the courage
to pursue them.”*

Walt Disney

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Miguel Carreira um muito muito obrigado por toda a ajuda e paciência nestes últimos meses. Por todos os conhecimentos transmitidos, por ter aceitado co-orientar o meu estágio e dissertação de Mestrado e essencialmente pela excelente pessoa, profissional, Médico e Professor que é.

Ao Dr. Josep Arús Martí por me ter recebido na sua clínica, por ter aceitado ser meu orientador de estágio e por toda a ajuda disponibilizada durante a minha estadia em Barcelona.

Ao Professor Telmo pela grande ajuda na análise estatística e extrema paciência a ensinar “estatística para totós”.

Aos Médicos Veterinários do CMVAA: ao Dr. Pedro Azevedo, à Dra. Alexandra Costa e à Dra. Eva Mendes pela disponibilidade em ensinar e ajudar no que fosse necessário, por todos os conhecimentos transmitidos e momentos de descontração proporcionados durante todo o estágio. Ao Sr. Carreira e Dna Dina pela boa receção e acolhimento. Ao Nicolau, ao Golias e ao Rhino, os patudos do centro.

A toda a equipa da Arvivet Veterinaris: Alba, David Bernardo, Sandra, Juani, Merche, Jorge, David, Dani, Fidel, Rafa e Ferran, que me receberam e integraram da melhor maneira.

À Carolina Gonçalves e à Sara Pires, minhas companheiras de aventuras por terras catalãs.

Aos meus colegas de estágio no CMVAA. À Matilde Vítor pelos momentos de boa disposição diários e ao João Cotta por todo o companheirismo e entreaajuda ao longo dos 3 meses de estágio.

Aos amigos que a faculdade me trouxe e que comigo viveram todos os momentos caraterísticos desta etapa: Carolina Gonçalves, Ricardo Cavalheiro, Joana Domingues, Rita Cruz, Joana Oliveira, Sofia Dias e Sophie Branco.

Ao Rui Encarnação, à Ana Cláudia Jesus e ao Ricardo Cavalheiro, com os quais partilhei 2 anos da minha vida no ISA e os quais levo comigo para a vida.

Aos meus amigos de sempre Sofia, Miguel, Ângela e Teresa que sempre me apoiaram e estiveram presentes ao longo de todo o percurso.

Ao Iuri que esteve ao meu lado durante todos estes anos, que sempre me apoiou e incentivou à realização deste sonho e que como tal não poderia encerrar esta etapa sem lhe agradecer.

Ao Huguinho, ao Drocas e ao Tiago Maria que assistiram de perto estes últimos meses. E ao Pedro Alves por todo o apoio, ajuda e incentivo que foram fundamentais nesta última fase, por toda a paciência e disponibilidade nestes últimos dias.

Para o fim, mas não menos importante, à pessoa que proporcionou tudo isto, que se sacrificou desde sempre para que eu pudesse chegar aqui e para quem um obrigado não é suficiente, à minha Mãe! Ao meu Pai, que não escolheu não estar presente, mas que sempre estará.

Ao Pongo, o meu maior companheiro, o meu melhor amigo, que tantas vezes viu a bola trocada pelos livros e mesmo assim continua a abanar a cauda com uma simples festa de consolação.

À minha família, em especial à Avó Maria que foi uma ajuda fundamental ao longo de todo este percurso e que possibilitou a sua conclusão.

À Pandora, à Quiara, à Kiubi, à Luna, ao Hércules e ao Piruças, em quem tantas vezes pratiquei exames de estado geral e palpações abdominais. À Duquesa, a minha primeira gata, que desde cedo me fez perceber o caminho a seguir.

E a todos os animais que já passaram pela minha vida pessoal e académica e de uma maneira ou de outra deixaram a sua marca e contributo para a minha formação.

ESTUDO PRELIMINAR DA VARIAÇÃO DOS NÍVEIS DE CORTISOL EM DOENTES DA ESPÉCIE *CANIS FAMILIARIS* SUJEITOS A MASTECTOMIA POR DOENÇA ONCOLÓGICA DA MAMA

RESUMO

A esperança média de vida dos animais domésticos tem sido uma variável crescente à qual se junta um aumento do aparecimento de doenças associadas à geriatria, nas quais se destaca a doença oncológica da mama. Em Medicina Humana são já diversos os estudos que relacionam a concentração de cortisol com o comportamento dos tumores mamários. O presente estudo foi realizado numa amostra de 15 indivíduos da espécie *Canis familiaris* (N=15), do género feminino, com diagnóstico de tumor de mama, e sujeitos a mastectomia total unilateral. Teve como objetivos: 1) caracterizar a variação das concentrações de cortisol num período pré- e pós-cirúrgico; 2) estudar a relação entre as concentrações de cortisol e a sua variação com os parâmetros: idade, peso vivo, localização das massas tumorais, número de mamas envolvidas na doença oncológica, estadiamento clínico da doença, presença de doenças de base, e estado teriogenológico da fêmea; e ainda 3) estudar a relação entre a idade e o peso vivo das doentes com os parâmetros: localização das massas tumorais, número de mamas envolvidas na doença oncológica e estadiamento clínico da doença. Cada doente foi sujeita a uma colheita biológica de sangue periférico para quantificação dos níveis de cortisol, em 2 tempos diferentes T0 (imediatamente pré-cirurgia) e T1 (10 dias após a cirurgia). Os resultados obtidos revelaram que existiu uma diminuição na média de valores de cortisol de T0 para T1, o que pode ser explicado pela remoção da massa tumoral, e que de todos os parâmetros estudados apenas o peso tem uma relação estatisticamente significativa com os níveis de cortisol, provavelmente devido ao efeito direto dos glucocorticoides no tecido adiposo.

PALAVRAS - CHAVE: Cadela, Cortisol, Mama, Tumor, Mastectomia

PRELIMINARY STUDY OF CORTISOL LEVEL VARIATIONS IN *CANIS FAMILIARIS*
PATIENTS SUBMITTED TO MASTECTOMY DUE TO MAMMARY TUMOUR DISEASE

ABSTRACT

The lifespan of domestic animals has been an increasing variable. Along with that, geriatric diseases have raised, from which breast cancer is highlighted. In Human Medicine, several studies correlate the cortisol level with the behavior of breast tumors. The present study used a sample of 15 bitches (N=15), previously diagnosed with breast tumor and submitted to a unilateral total mastectomy, and aimed 1) to characterize the cortisol levels variation between the pre and post surgical period; 2) to study the relationship between cortisol levels variation with parameters such as age, body weight, mammary location of the tumors, the location of the affected mammary gland, the clinical stage of the disease, the presence of underlying diseases and the bitch theriogenological state; and 3) to investigate the relationship between the age and body weight of patients and the parameters mammary location of the tumors, the location of the affected mammary gland, the clinical stage of the disease. A sample of peripheral blood was collected from each patient in order to quantify the cortisol levels in two different time points T0 (immediately before surgery) and T1 (10 days after surgery). The obtained results revealed that cortisol levels decrease from T0 to T1, which can be explained by the tumor excision. From all the studied parameters, only the body weight showed statistically significant differences with the cortisol levels, probably due to a direct effect of glucocorticoids on the fat tissue.

KEYWORDS: Bitch, Cortisol, Breast, Tumor, Mastectomy

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS.....	iv
RESUMO.....	vi
ÍNDICE GERAL	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
ÍNDICE DE TABELAS.....	x
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	xi
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS.....	xii
A - RELATÓRIO DO PERÍODO DE ESTÁGIO	1
B - INTRODUÇÃO	3
1. O CORTISOL.....	3
1.1. Anatomia e Embriologia do eixo Hipotálamo – Hipófise – Adrenal (HHA).....	3
1.2. A glândula adrenal na sua função	8
1.3. Mecanismo de ação e ações do cortisol.....	12
1.4. Regulação e variações do cortisol.....	15
1.5. Doseamento do cortisol.....	17
2. ONCOLOGIA DA GLÂNDULA MAMÁRIA.....	19
2.1. Anatomia e embriologia da mama	19
2.2. Oncobiologia	24
2.3. Neoplasias mamárias.....	26
2.3.1. Epidemiologia e Etiologia	26
2.3.2. Patogénese	27
2.4. A clínica do doente com neoplasia mamária	29
3. A RELAÇÃO DO CORTISOL COM A DOENÇA ONCOLÓGICA DA MAMA	36
C - ESTUDO CLÍNICO.....	38
1. OBJETIVOS.....	38
2. MATERIAIS E MÉTODOS	38
3. RESULTADOS.....	40
3.1. Estatística descritiva.....	40
3.2. Estatística inferencial	41
4. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES.....	46
5. PERSPETIVAS FUTURAS	49
D – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	50
E - ANEXOS	55

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Representação do Eixo Hipotálamo – Hipofisário e das vias neurosecretores (Adaptada de Cochran, 2011)	4
Figura 2 – Fotografia com ampliação de 20x de corte histológico da glândula adrenal de um cão saudável (Rijnberk et al., 2010)	7
Figura 3 – Esquema da síntese de hormonas esteroides no córtex adrenal (Adaptado de Ortsäter, Sjöholm, & Rafacho, 2012 e Hall, 2016)	10
Figura 4 – Esquema representativo do mecanismo de ação das hormonas esteroides (Adaptado de Greco, 2013)	13
Figura 5 – Esquema representativo da ação dos glucocorticoides (Adaptado de Papich, 2015)	13
Figura 6 – Esquema representativo da anatomia do sistema do seio lactífero (Adaptado de Evans & Miller, 2013)	20
Figura 7 – Microfotografia com ampliação de 70x de glândulas mamárias túbulo-alveolares compostas (Dyce et al., 2010)	21
Figura 8 – Esquema representativo da topografia e rede linfática das glândulas mamárias da cadela (Adaptado de Evans & Miller, 2013)	22
Figura 9 – Esquema representativo dos vasos sanguíneos das últimas 3 glândulas mamárias (Adaptado de Evans & Miller, 2013)	23
Figura 10 – Árvore de decisão clínica na abordagem de caso de neoplasia canina e felina (Adaptada de Dobson & Lascelles, 2011)	33

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Causas de alteração da concentração plasmática de cortisol em cães e gatos (Adaptada de Nelson et al, 2012).....	17
Tabela 2 - Diferenças nas características de tumores benignos e malignos da cadela (Adaptada de Euler, 2011)	24
Tabela 3 - Tipos histológicos e frequência dos diferentes tumores mamários em cães (Adaptada de Goldschmidt, Pena, Rasotto, & Zappulli, 2011; e Morris & Dobson 2001)	28
Tabela 4 - Classificação TNM (Adaptada de Dobson & Lascelles, 2011).....	30
Tabela 5 – Estadiamento clínico (Adaptada de Dobson & Lascelles, 2011).....	30
Tabela 6 – Análise de estatística descritiva dos dados referentes à caracterização da amostra utilizada no estudo (n=15), considerando os parâmetros idade, peso vivo, raça, teriogenologia, dimensão dos nódulos mamários, número de mamas envolvidas, localização da lesão, tipo de mastectomia realizada, estadio clínico da doente (TNM), valor de cortisol e doença de base.....	41
Tabela 7 – Análise estatística inferencial em relação à idade, peso e estadio clínico dos doentes	42
Tabela 8 – Análise estatística inferencial em relação às concentrações de cortisol	45

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Correlação entre a concentração de cortisol em T0 e o peso dos doentes	43
Gráfico 2 – Correlação entre as concentrações de cortisol em T0 e em T1	44
Gráfico 3 – Diferença nas concentrações de cortisol em T0 e em T1	44
Gráfico 4 – Frequência relativa das diferentes espécies	56
Gráfico 5 – Frequência relativa da casuística em diferentes áreas da Clínica de Pequenos Animais	56
Gráfico 6 – Frequência relativa das diferentes espécies em várias áreas da Medicina Interna	57
Gráfico 7 – Frequência relativa das diferentes espécies em várias áreas da Medicina Preventiva	57
Gráfico 8 – Frequência relativa das diferentes espécies em várias áreas da Cirurgia	58
Gráfico 9 – Frequência relativa da casuística em diferentes áreas da Imagiologia	58

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

® – Marca registrada

ACh – Acetilcolina

ACTH – Corticotrofina / hormona adenocorticotrófica (*Adrenocorticotropic Hormone*)

ADH – Vasopressina / hormona antidiurética / (*Antidiuretic Hormone*)

AgNOR – Regiões organizadoras do nucléolo argirofílico (*Argyrophilic Nucleolar Organizing Regions*)

AINEs – Anti-Inflamatórios Não Esteroides

AP-1 – Proteína ativadora 1 (*Activator Protein*)

ATP – Adenosina trifosfato (*Adenosine Triphosphate*)

BRCA – Gene de suscetibilidade ao cancro (*Breast Cancer susceptibility gene*)

CAFs – Fibroblastos associados ao cancro (*Cancer-Associated Fibroblast*)

CAMs – Moléculas de adesão celular (*Cell Adhesion Molecules*)

CBG – Globulina ligante de corticosteroide / transcortina (*Corticosteroid-binding Globulin*)

CID – Coagulação Intravascular Disseminada

CMVAA – Centro de Medicina Veterinária Anjos de Assis

COMT – Catecolamina-O-metiltransferase

COX-1 – Ciclooxygenase-1

COX-2 – Ciclooxygenase-2

CPPP – Ciclopentanoperidrofenantreno (*Cyclopentanoperhydrophenanthrene*)

CRH – Hormona libertadora de corticotrofina (*Corticotropin-releasing Hormone*)

DHEA – Dehidroepiandrosterona

DOPA – Dihidroxifenilalanina (*Dihydroxyphenylalanine*)

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético (*Ethylenediamine Tetraacetic Acid*)

EGFR – Recetor do fator de crescimento epitelial (*Epithelial Growth Factor Receptor*)

EIA – Enzimaimunoensaio (*Enzyme Immunoassay*)

ER – Recetor de estrogénio (*Estrogen Receptor*)

FGF – Fator de crescimento de fibroblastos (*Fibroblast Growth Factor*)

FSH – Hormona estimulante dos folículos (*Follicle Stimulating Hormone*)

GH – Hormona do crescimento (*Growth Hormone*)

GR – Recetores glucocorticoides (*Glucocorticoid Receptor*)

HER – Recetor do fator de crescimento epidérmico humano (*Human Epidermal growth factor Receptor*)

HHA – Eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal

HSD – Hidroxisteroide dehidrogenase

IC – Insuficiência Cardíaca

IFN – Interferão
 IGF – Fator de crescimento semelhante à insulina (*Insulin-like growth factor*)
 IL – Interleucina
 iNOS – Óxido nítrico sintetase induzível (*Inducible Nitric Oxide Synthase*)
 LDL – Lipoproteínas de baixa densidade (*Low Density Lipoproteins*)
 LH – Hormona luteinizante (*Luteinizing Hormone*)
 MAO – Monoamina oxidase
 MC2R – Recetor de melanocortina 2 (*Melanocortin receptor 2*)
 MDSC – Células supressoras derivadas da linhagem mieloide (*Myeloid-Derived Suppressor Cells*)
 MR – Recetores mineralocorticoides (*Mineralocorticoid Receptor*)
 mRNA – RNA mensageiro (*Messenger RNA*)
 MSH – Hormona estimulante dos melanócitos (*Melanocyte Stimulating Hormone*)
 NK – *Natural Killer*
 OVH – Ovariectomia
 P450ssc – Colesterol desmolase / Enzima de clivagem da cadeia lateral do colesterol (*side chain cleavage enzyme*)
 PAAF – Punção Aspirativa por Agulha Fina
 PCNA – Antígeno nuclear de proliferação celular (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*)
 PGE₂ – Prostaglandina E₂
 POMC – Pro-opiomelanocortina
 PR – Recetor de progesterona (*Progesterone Receptor*)
 RIA – Radioimunoensaio (*Radioimmunoassay*)
 RM – Ressonância magnética
 RNA – Ácido ribonucleico (*Ribonucleic Acid*)
 SNC – Sistema Nervoso Central
 StAR – Proteína reguladora da esteroidogénese aguda (*Steroidogenic Acute Regulatory protein*)
 STH – Somatotrofina (*Somatotropic Hormone*)
 TC – Tomografia Computorizada
 TGF-β – Fator transformador de crescimento-β (*Transforming Growth Factor-β*)
 TNF – Fator de necrose tumoral (*Tumor Necrosis Factor*)
 TSH – Hormona estimulante da tiroide / tirotrofina (*Thyroid Stimulating Hormone*)
 VEGF – Fator de crescimento vascular endotelial (*Vascular Endothelial Growth Factor*)
 zF – Zona fasciculada
 zG – Zona glomerulosa
 zR – Zona reticulada

A - RELATÓRIO DO PERÍODO DE ESTÁGIO

O estágio curricular, do curso de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária, da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, foi repartido em dois trimestres realizados em diferentes locais, durante um período total de 6 meses, de setembro a dezembro de 2014 e de janeiro a abril de 2015, perfazendo um total de aproximadamente 1078 horas (430 horas no primeiro período de estágio e 648 no segundo).

O primeiro trimestre decorreu na clínica veterinária Arvivet Veterinaris, em Terrassa, Barcelona – Espanha, sob a orientação do Doutor Josep Arús Martí, e o segundo trimestre no Centro de Medicina Veterinária Anjos de Assis (CMVAA), no Barreiro, sob a orientação do Professor Doutor Miguel Carreira. Durante este período tive a oportunidade de adquirir, consolidar e aplicar conhecimentos nas áreas da medicina interna, medicina preventiva, imagiologia, cirurgia geral e de especialidade, medicina laboratorial, internamento e gestão de *stocks*, bem como compreender melhor as relações interpessoais entre colegas, e ainda Médico Veterinário – proprietário do animal.

Do total dos pacientes observados, 65,7% foram canídeos, 29,1% felídeos e 5,2% foram animais de outras ordens e classes tais como roedores, lagomorfos, quelónios e aves.

Durante o período de estágio, participei em diferentes tarefas associadas às diferentes áreas de atuação. Assim, na Medicina Interna tive a possibilidade de realizar exames físicos objetivos e contenção dos pacientes; tratamento de feridas e realização de pensos; explicação de resultados de exames complementares de diagnóstico; monitorização e terapêutica de doentes internados; diários clínicos médicos; colheita de amostras biológicas; cateterização; algaliação; e protocolos de fisioterapia com electroestimulação e laser médico. Ao longo do período foi-me ainda proposto elaborar diversas prescrições médicas para casos clínicos, lista de diagnósticos diferenciais e exames complementares, bem como a realização de duas exposições orais, para toda a equipa do CMVAA sobre temas de medicina interna. Do total da casuística observada na área de Medicina Interna, 14% foram casos de Gastroenterologia; 9,1% de Ortopedia e Traumatologia; 7,8% de Oncologia; 7,3% de Pneumologia; 7,3% de Infeciologia; 6,8% foram de Dermatologia; 6,2% de Cardiologia; 5,7% de Nefrologia e Urologia; 5,5% de Neurologia; 4,7% de Reprodução e Obstetrícia; 3,9% de Oftalmologia; 3,9% de Otorrinologia; 3,6% de Estomatologia; 2,1% de Endocrinologia; 0,8% de Toxicologia e 11,4% de outros casos.

Na medicina preventiva, realizei a preparação e inoculação de vacinas; preenchimento de boletins de sanidade de cão e gato; protocolos vacinais e de desparasitação, identificação eletrónica e registos legais de animais de companhia. Nesta área a casuística foi dividida em Vacinação Profilática (77,9%), consultas para colocação de Identificação Eletrónica (13,3%) e Primeira Consulta (8,8%) informativa para proprietários que adotam um novo animal de companhia.

Na medicina laboratorial, fui responsável pelo normal funcionamento do laboratório interno do CMVAA, assegurando as tarefas de processamento e conservação de amostras, realização de análises bioquímicas, urianálises, exames coprológicos e serológicos, registo de resultados, preparação e envio de amostras para laboratório externo, bem como o preenchimento das suas requisições. Durante este período, estive ainda responsável pela elaboração do conjunto de análises pré-cirúrgicas necessárias a cada paciente bem como a realização de esfregaços sanguíneos e de punção aspirativa por agulha fina (PAAF). No laboratório da Arvivet Veterinaris procedi ainda à execução de hemogramas e coloração de citologias vaginais e auriculares com observação ao microscópio.

No campo da imagiologia, realizei o posicionamento e contenção dos pacientes, revelação e avaliação das imagens obtidas de exames radiográficos (simples e contrastados – trânsitos baritados). Participei ainda em exames de ultrassonografia e eletrocardiografia.

Na cirurgia desenvolvi tarefas de ajudante de cirurgião, circulante e anestesista em cirurgia ortopédica e de tecidos moles. Preparação e organização de trouxas cirúrgicas e batas para esterilização. Enquanto ajudante de cirurgião tinha ainda a responsabilidade de contactar no final da cirurgia o proprietário do doente informando-o de como correu e como se encontrava o seu animal. Foi-me ainda permitido realizar orquiectomias de gato, ovariosterectomia de gata e exérese de pequenos nódulos cutâneos, sempre sob supervisão de um Médico Veterinário experiente. Como circulante preparei a sala de cirurgia e todo o material necessário ao procedimento a realizar; preparei o cirurgião e o ajudante de cirurgião; forneci qualquer instrumento, fármaco ou outro material que fosse solicitado durante a cirurgia; e preparei o internamento para receção do doente após a cirurgia. Na condição de anestesista fui responsável por preparar a pré-medicação e todo o material necessário à indução do paciente; intubação e extubação do mesmo; monitorização anestésica peri-operatória do animal até ao final do recobro. Sob responsabilidade única perfiz um total de 24h de anestesia geral. Nesta área a casuística observada correspondeu a cerca de 52,9% de cirurgias de tecidos moles, 8,7% de cirurgias ortopédicas e 38,5% de pequenas cirurgias.

Na área de reprodução e obstetrícia procedi a cuidados neonatais pós-cesariana, diagnósticos de gestação, e inseminação artificial intrauterina por endoscopia na Arvivet Veterinaris e técnica clássica no CMVAA. O relatório do período de estágio na Arvivet Veterinaris encontra-se disponível no Anexo 1 e a descrição estatística detalhada da casuística acompanhada em Anexo 2.

B - INTRODUÇÃO

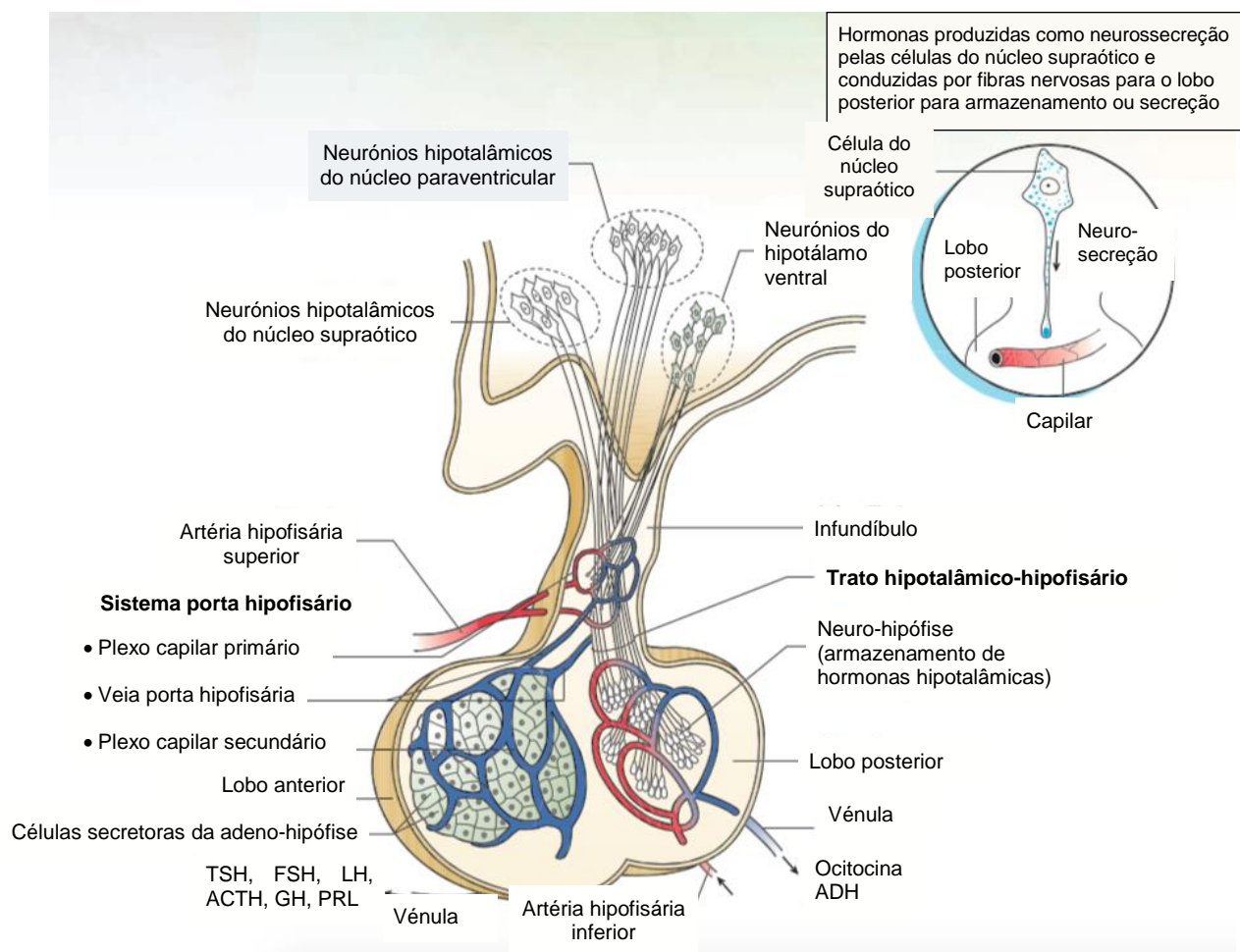
1. O CORTISOL

1.1. Anatomia e Embriologia do eixo Hipotálamo – Hipófise – Adrenal (HHA)

O eixo Hipotálamo – Hipófise é um sistema central de regulação endócrina que atua tanto em glândulas endócrinas periféricas por meio de hormonas tróficas, como diretamente em células ou órgãos periféricos através de hormonas-efetoras hipofisárias, como a prolactina (Budras, McCarthy, Fricke, & Richter, 2007).

Durante o desenvolvimento embrionário há formação de diversos tecidos e órgãos provenientes de 3 folhetos embrionários: ectoderme, mesoderme e endoderme. O tubo neural, com um polo cefálico e um outro caudal, é formado a partir da ectoderme. Do polo cefálico desenvolvem-se 3 vesículas encefálicas primárias: o prosencéfalo, o mesencéfalo e o rombencéfalo, que irão dar origem aos diversos órgãos do sistema nervoso central (SNC). O prosencéfalo (a mais cranial dessas vesículas) vai desenvolver-se e originar o telencéfalo a partir do qual se formam os 2 hemisférios cerebrais, e o diencéfalo que origina, entre outros órgãos, o hipotálamo e a neuro-hipófise. O diencéfalo (situado na região mediana do prosencéfalo) é formado por duas placas alares (sensoriais) e desprovido de placas basais (motoras). A partir deste formam-se a glândula pineal, o plexo coroide do 3º ventrículo, o tálamo (dorsal) separado do hipotálamo (ventral) através do sulco hipotalâmico, e parte da hipófise ligada ao hipotálamo pelo infundíbulo (Sadler & Langman, 2004). O hipotálamo, que é responsável pela regulação e o controlo de grande parte das funções autónomas do indivíduo tais como a temperatura corporal, o comportamento sexual, a sede e a fome, constitui as regiões ventral e medial do diencéfalo, formando também o pavimento do 3º ventrículo. Está limitado rostralmente pelo quiasma e trato óticos e estende-se caudalmente até aos corpos mamilares (Braund 2003), que são as únicas estruturas mielinizadas do hipotálamo. Inclui ainda o *tuber cinereum* e a eminência média. Encontra-se topograficamente dividido em 3 regiões: a rostral (da qual fazem parte os núcleos pré-ótico, hipotalâmico rostral, paraventricular e supraótico), a região intermédia (ou tuberal) e a região caudal onde estão localizados diversos núcleos, como o núcleo infundibular. Estes núcleos localizados no hipotálamo convergem para formar o trato hipotalâmico-hipofisário que estabelece conexões neurovasculares com a hipófise, essenciais à regulação desta. A regulação da adeno-hipófise ocorre através do sistema porta-hipofisário, representado na Figura 1, onde capilares no hipotálamo ventral são responsáveis pelo transporte das hormonas aí produzidas até às células secretoras da adeno-hipófise (Sisson, Grossman, & Getty, 1975; Cochran, 2011).

Figura 1 – Representação do Eixo Hipotálamo – Hipofisário e das vias neurosecretoras
(Adaptada de Cochran, 2011)



A hipófise apresenta duas origens embriológicas diferentes: 1) a bolsa de Rathke, uma evaginação da ectoderme da cavidade oral a partir da qual se formam a adeno-hipófise (lobo anterior) na parede anterior e a parte intermédia na parede posterior; e 2) o infundíbulo, uma evaginação ventral do diencéfalo que dará origem à neuro-hipófise (lobo posterior) e ao pedículo, formados por células neurogliais e algumas fibras nervosas hipotálâmicas. A parte tuberal, que circunda o pedículo do infundíbulo forma-se como uma extensão da adeno-hipófise. Embora formada por 1 lobo anterior, 1 lobo posterior e uma parte intermédia, a hipófise é uma glândula de reduzidas dimensões, localizada na fossa hipofisária da *sella turcica*, no corpo do osso basisfenóide, ventralmente ao hipotálamo, e encapsulada pela dura-máter, exceto na zona infundibular (Sisson et al., 1975). A adeno-hipófise é formada pela *pars distalis*, *intermedia* e *tuberalis*, sendo que a primeira é a parte da glândula que secreta um maior número de hormonas, tais como: 1) a somatotrofina (STH) ou a hormona do crescimento (GH) – responsável pelo desenvolvimento do sistema esquelético; 2) a hormona estimulante dos folículos (FSH) – uma gonadotrofina que estimula a diferenciação e crescimento folicular ovário e espermatogénese; 3) a hormona

luteinizante (LH) – uma gonadotrofina que estimula a produção de testosterona pelas células de Leydig; 4) a tirotrofina (TSH) – que controla e estimula a glândula tiroide; 5) a corticotrofina (ACTH) – responsável pela estimulação e controlo do córtex adrenal; e 6) a prolactina – responsável pela secreção de leite nos adenócitos da glândula mamária (Braund 2003). O lobo posterior da glândula, também designado de neuro-hipófise *pars nervosa*, é constituído por axónios de neurónios neurosecretores que diferem dos neurónios transmissores de impulsos por não inervarem outros neurónios. O seu produto é secretado diretamente na circulação sanguínea e pode atuar em locais distantes do neurónio secretor endócrino. A neuro-hipófise funciona como uma extensão do hipotálamo para dentro da hipófise (Figura 1) que possui os corpos celulares dos seus neurónios nos núcleos supraóptico e paraventricular do hipotálamo, e as terminações nervosas dos axónios no lobo posterior da hipófise. Este lobo tem a função de armazenar e libertar hormonas produzidas nesses núcleos do hipotálamo como: 1) a vasopressina (ADH) – responsável pelo aumento da pressão sanguínea e diminuição da diurese, e 2) a ocitocina – essencial para a contração do útero e células mioepiteliais da glândula mamária. A hipófise é irrigada pelas artérias hipofisárias superior e inferior (provenientes da artéria carótida interna) e artéria comunicante caudal (do círculo arterial cerebral), sendo a drenagem venosa assegurada pelos seios cavernoso e intercavernoso (Sisson et al., 1975; Hullinger, 2013).

A glândula adrenal ou suprarrenal, é um órgão par composto por um córtex e uma medula, localizando-se no tecido retroperitoneal ao longo do polo cranial medial de cada um dos rins estando a glândula direita mais cranial e ventral ao processo transversal da última vértebra torácica (T13) e próxima à veia cava caudal; e a glândula esquerda por estar ventral ao processo transversal da segunda vértebra lombar (L2), em contacto com a artéria aorta abdominal (Hullinger, 2013). O aporte sanguíneo do órgão é assegurado pelos ramos adrenais craniais, provenientes das artérias frénica caudal e abdominal cranial; pelos ramos adrenais médios, a partir da aorta abdominal; e pelos ramos caudais com origem nas artérias renais e lombares. Estes 3 ramos arteriais atingem a superfície exterior do córtex, formando o plexo capilar subcapsular, de onde partem capilares fenestrados até à zona reticulada onde originam as veias medulares que vão formar as veias adrenais. Algumas das arteríolas continuam através do córtex para fornecer sangue diretamente à medula. Enquanto a veia adrenal da glândula direita, devido à sua posição relativamente à veia cava caudal, drena diretamente nesta, a veia adrenal esquerda vai drenar na veia renal esquerda ou na veia frénica caudal. Podem ainda ser observadas anastomoses arteriovenosas no tecido conjuntivo em redor de ambas as glândulas. Por todo o órgão (cápsula, córtex, transição corticomedular e medula) existe um extenso plexo de vasos linfáticos que vão drenar nos linfonodos aórticos lombares. A inervação autónoma do órgão,

predominantemente simpática, é feita pelo plexo suprarrenal que comunica com o nervo esplâncnico maior e com o plexo celiacomesentérico e existe ainda alguma inervação parassimpática exercida pelos nervos frénico e vagal. A maioria dos plexos nervosos que inervam a glândula e que se localizam na região capsular, penetram no córtex em associação com os vasos sanguíneos e, à semelhança da estrutura vascular, terminam ao nível da medula adrenal (Xing, Lerario, Rainey, & Hammer, 2015). Esta glândula é formada por duas regiões endócrinas diferentes denominadas de córtex e medula, com características distintas tanto micro (Figura 2) como macroscopicamente. Ao corte transversal, enquanto o córtex tem uma coloração creme ou amarela brilhante devido ao elevado conteúdo lipídico, a medula assume uma coloração castanho-avermelhada devido à grande quantidade de sangue presente nas veias medulares. Durante o desenvolvimento embrionário, ambas as estruturas desenvolvem-se a partir de 2 tecidos distintos que se fundem de modo a originarem a uma única estrutura anatómica – a Adrenal (Kyle, 2015).

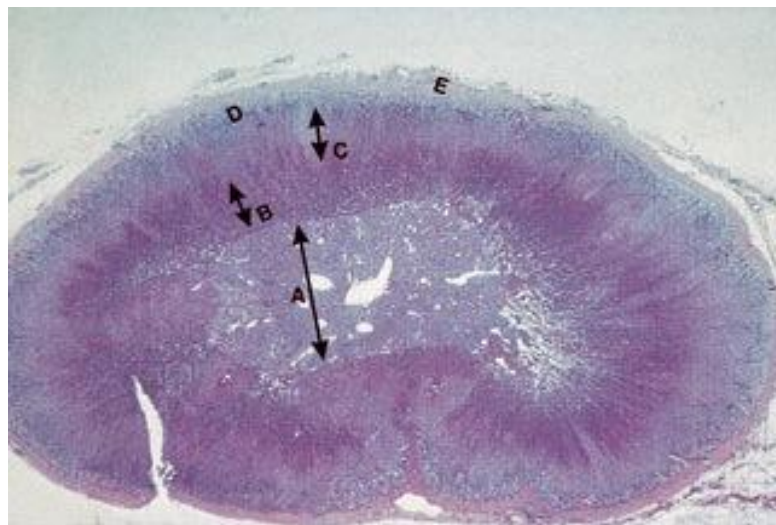
O córtex fetal inicia o seu desenvolvimento muito cedo no embrião a partir da mesoderme intermédia, na base do mesentério dorsal e próximo aos polos craniais dos mesonefros, derivando de uma proliferação de células que se vão acumulando e organizando progressivamente em cordões. Aquando da formação dos gânglios simpáticos, ocorre uma migração de células cromafins da crista neural ectodérmica que se diferenciam em células glandulares da medula adrenal, capazes de produzir secreção interna (adrenalina e noradrenalina) e que invadem o córtex atingindo uma posição central, formando-se assim a medula adrenal que compõe 10% a 20% do volume total do órgão. É constituída por células de grandes dimensões que quando coradas com dicromato de potássio, adquirem uma tonalidade castanha devido a reações de oxidação e polimerização das catecolaminas. Estas duas estruturas são posteriormente envolvidas por uma cápsula de tecido conjuntivo mesenquimatoso disposto irregularmente e que é constituída por uma parte interna – a *pars cellulosa*, e outra externa – a *pars fibrosa* (Hullinger, 2013). Após o nascimento, o córtex fetal regride dando origem a um córtex definitivo estruturado em 3 zonas diferenciadas (Figura 2) e produtoras de hormonas esteroides específicas: as zonas glomerulosa (zG), fasciculada (zF) e reticulada (zR).

A zG situada logo abaixo da cápsula adrenal, estreita (cerca de 25% do córtex adrenal) e com limites pouco definidos, é formada por células de pequenas dimensões e pobres em lípidos formando “cordões enrodilhados”. As células desta zona, são deficientes em atividade da enzima 17 α -hidroxilase, sendo por isso apenas capazes de produzir mineralocorticoides, como é o caso da aldosterona (Sisson et al., 1975).

A zF, caracteriza-se por ser mais espessa, compõe mais de 50% do córtex da adrenal e tem uma localização intermédia. É constituída por colunas de células relativamente grandes e com um elevado conteúdo citoplasmático lipídico o qual é perdido nos cortes histológicos de material incluído em parafina, dando às células um aspeto vacuolizado. Estes cordões alongados de células banhados por sangue sinusoidal, são responsáveis pela produção de glucocorticoides (cortisol e corticosterona) e uma pequena quantidade de androgénios (Rijnberk, A., & Kooistra, H. S., Galac, S., Reusch, C. E., 2010).

A zona mais interna do córtex adrenal é denominada zR (aproximadamente 15% do córtex) sendo composta por células de menores dimensões do que as da zona anterior, com citoplasma granular denso e de baixo conteúdo lipídico, sendo por isso denominadas “células compactas”. Estas células organizam-se formando cordões irregulares e anastomosados, com sinusoides entre eles, o que lhe confere um aspeto escuro quando observada a olho nu. Aqui são produzidos os androgénios (androstenediona) e ainda alguns glucocorticoides. Estas 2 últimas zonas funcionam em conjunto como uma só unidade, para a produção de hormonas sexuais e glucocorticoides (Rijnberk et al., 2010).

Figura 2 – Fotografia com ampliação de 20x de corte histológico da glândula adrenal de um cão saudável (Rijnberk et al., 2010)



(A) medula adrenal; (B) zona reticular do córtex; (C) zona fasciculada do córtex; (D) zona glomerulosa do córtex; (E) cápsula adrenal

1.2. A glândula adrenal na sua função

Essencial à vida, a glândula adrenal é formada por 3 unidades funcionais distintas: 1) a medula responsável pela secreção de catecolaminas, 2) a zG do córtex que secreta mineralocorticoides e 3) as zF e zR do córtex produtoras de glucocorticoides (Kemppainen & Behrend, 1997).

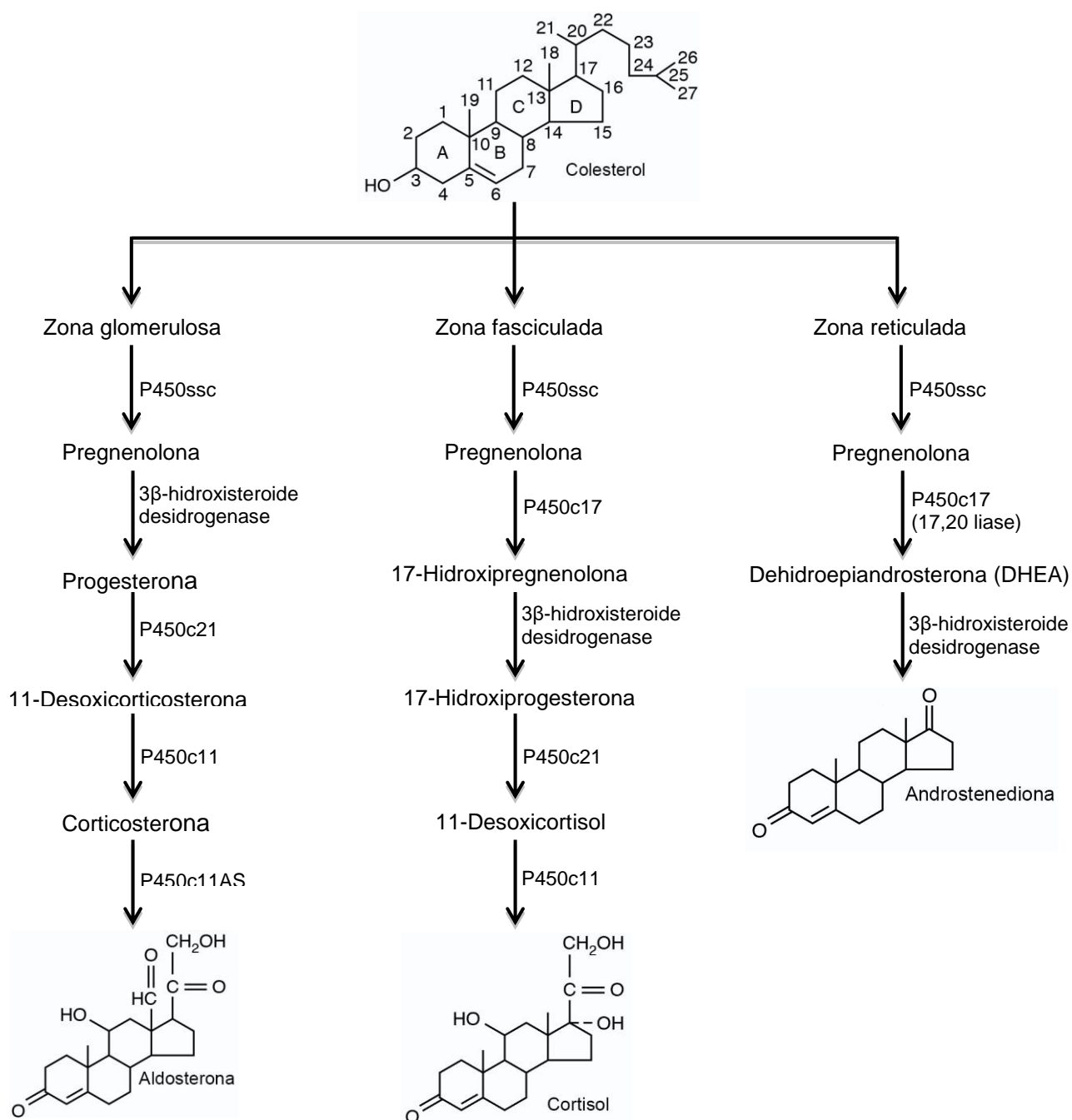
A medula adrenal, constitui a zona mais interna do órgão, sendo similar a um grande gânglio simpático sem fibras pós-ganglionares. É constituída por células cromafins responsáveis pela produção de catecolaminas (adrenalina e noradrenalina), que são hormonas simpaticomiméticas, com um curto tempo de semi-vida (< 5 minutos), e produzidas a partir do aminoácido tirosina sendo posteriormente armazenadas em grânulos secretores dentro das células cromafins de modo a estarem disponíveis para serem libertadas a uma taxa constante que aumenta consoante as necessidades do indivíduo (Kemppainen & Behrend, 1997). No citosol, a L-tirosina é convertida pela enzima tirosina hidroxilase em L-DOPA (dihidroxifenilalanina), e posteriormente pela ação da DOPA-descarboxilase pode ser convertido em dopamina. Já no interior dos grânulos secretores, a dopamina é convertida em noradrenalina por ação da enzima dopamina- β -hidroxilase, após ser transportada novamente para o citosol sofre a ação da enzima feniletanolamina-N-metiltransferase para ser convertida em adrenalina que entra então para os grânulos correspondentes (Greco, 2013). A ação desta última enzima é induzida pelos glucocorticoides produzidos no córtex adrenal, os quais chegam às células cromafins através do fluxo sanguíneo adrenal que circula no sentido do córtex para a medula (Kemppainen & Behrend, 1997). Em resposta a sinais estimulatórios como a hipovolemia, a hipoxia, a hipotensão, a hemorragia, a hipoglicemia, a cirurgia, o exercício físico e a percepção de perigo, ocorre a estimulação da sua secreção na circulação. Através do sistema nervoso simpático, ocorre uma estimulação dos nervos simpáticos pré-ganglionares dentro da medula adrenal conduzindo a uma libertação de acetilcolina (ACh) a qual se liga e ativa os recetores nas células cromafins, promovendo a fusão dos grânulos secretores com a membrana celular e consequente libertação do seu conteúdo (catecolaminas, adenosina-trifosfato (ATP), cromograninas, encefalinas, DOPA e dopamina) que inibem a enzima conversora (Greco, 2013). Das catecolaminas libertadas pela medula, a adrenalina é a que é libertada em maior quantidade, representando uma grande importância devido à necessidade de uma menor concentração para induzir efeito, comparativamente à noradrenalina. Quando libertadas no sangue ambas vão atuar nos recetores α e β -adrenérgicos presentes em diversos tecidos-alvo que apresentam diferentes sensibilidades, sendo a resposta dose – dependente (Kemppainen & Behrend, 1997). Consoante o tecido e o tipo de recetores onde atuam, as catecolaminas vão aumentar a frequência e força de contração cardíacas; a vasoconstrição

(aumentando a resistência vascular periférica) ou vasodilatação; a pressão sanguínea; a glicemia (por neutralização da ação depressora da insulina); a liberação de ACTH; a glicogenólise no fígado (por estimulação do glucagon); e a lipólise (para produção de energia) (Cochran, 2011). São ainda responsáveis pela resposta ao *stress* agudo tendo uma ação semelhante à do glucagon e oposta à da insulina. O catabolismo das catecolaminas é rápido e realizado no fígado e rins (Greco, 2013). A conversão química destas hormonas é feita por reações de metilação, por ação da enzima catecolamina-O-metiltransferase (COMT), e de desaminação pela enzima monoamina oxidase (MAO). Da primeira reação obtêm-se os metabolitos metanefrina e normetanefrina, e da segunda os metabolitos ácido vanilmandélico (metabolito predominante) e metoxihidroxifenilglicol, que são posteriormente excretados na urina (Kyle, 2015).

Quanto ao córtex adrenal, ele é composto por 3 zonas onde são produzidos os diferentes esteroides, todos eles derivados do colesterol sintetizado no fígado. Todos contêm na sua estrutura química um núcleo ciclopentanoperidrofenantreno (CPPP) formado por um esqueleto de 17 carbonos dispostos em 4 anéis ligados entre si (Greco, 2013). Esta molécula precursora encontra-se armazenada como ésteres de colesterol derivados das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) em circulação, e encontram-se dentro de gotículas lipídicas nas células secretoras de esteroides sendo rapidamente convertidos em colesterol após receção de um sinal estimulatório (Kemppainen & Behrend, 1997). A estimulação pela ACTH ativa a enzima colesterol esterase a qual liberta o colesterol livre, servindo este de composto de partida para a síntese de esteroides.

O colesterol é posteriormente transportado para o interior da mitocôndria, mediado pela proteína reguladora da esteroidogénese aguda (StAR), onde a sua cadeia é clivada enzimaticamente, pela enzima desmolase P450ssc convertendo-o em pregnenolona, sendo este passo limitante da velocidade na esteroidogénese. A molécula final é então transferida para o exterior da mitocôndria e sequencialmente modificada de modo a formar os diferentes tipos de hormonas adrenais (Griffin & Ojeda, 2000). A Figura 3 representa a esteroidogénese hormonal.

Figura 3 – Esquema da síntese de hormonas esteroides no córtex adrenal (Adaptado de Ortsäter, Sjöholm, & Rafacho, 2012 e Hall, 2016)



(P450ssc) Colesterol desmolase ou enzima de clivagem da cadeia lateral do colesterol; (P450c21) 21-hidroxilase; (P450c11) 11β-hidroxilase; (P450c11AS) Aldosterona sintase; (P450c17) 17α-hidroxilase

Devido à sua estrutura lipofílica, as hormonas esteroides são secretadas imediatamente após formação por difusão simples através da membrana celular. Deste modo a síntese e a secreção encontram-se intimamente relacionadas, sendo a taxa de secreção controlada pela taxa de síntese. O metabolismo dos corticosteroides realiza-se a nível hepático pela conjugação destes com sulfatos e glucoronídeos, de modo a diminuir a potência e aumentar

a hidrossolubilidade para serem eliminados na urina (Rijnberk et al., 2010; Greco, 2013). Contrariamente às hormonas proteicas, que atuam por ligação a recetores situados nas membranas plasmáticas das células-alvo, as hormonas esteroides produzem efeito pela ligação a recetores localizados no citoplasma ou no núcleo das células. Estes recetores específicos e com alta afinidade estão presentes em quantidades muito superiores às necessárias para a produção de resposta biológica. Por isso a baixa concentração das hormonas no sangue é ainda assim eficaz na produção de resposta significativa nos tecidos, sendo que quanto maior a afinidade da hormona para o recetor mais duradoura é a resposta biológica obtida (Greco, 2013). Existem 2 tipos de recetores para a ligação de hormonas esteroides da suprarrenal: 1) tipo I ou recetores de mineralocorticoides (MR) (com maior afinidade para mineralocorticoides) e os 2) tipo II ou recetores de glucocorticoides (GR) (com maior afinidade para glucocorticoides). Contudo estes últimos esteroides, uma vez que circulam no sangue em níveis muito superiores aos primeiros, podem ligar-se a recetores tipo I com afinidade igual ou mesmo superior à dos mineralocorticoides (Kemppainen & Behrend, 1997; Tomlinson & Stewart, 2001; Arampatzis et al., 2005). Os MR medeiam as ações tónicas de retroalimentação dos níveis basais de corticosteroides, enquanto os GR estão envolvidos, além destes mecanismos, também em mecanismos de níveis elevados de glucocorticoides após exposição a situações de *stress* (Breen et al., 2004). A ação da hormona termina com a dissociação do complexo hormona-recetor, a qual ocorre frequentemente por diminuição da concentração plasmática da hormona (Greco, 2013).

A mais externa das 3 zonas do córtex, a zG é responsável pela produção de mineralocorticoides, dos quais a aldosterona é o mais importante, desempenhando funções na regulação do balanço eletrolítico e homeostase da pressão sanguínea (Greco, 2013). Considerando que a enzima 17 α -hidroxilase não apresenta atividade nesta zona, a zG é incapaz de sintetizar glucocorticoides e androgénios, contudo exerce um importante papel no fornecimento de células precursoras às zonas mais internas do córtex (Scott-Moncrieff, 2007). Tal como as restantes hormonas esteroides, a aldosterona é produzida a partir do colesterol num processo rápido e a sua produção é regulada principalmente pela ACTH, potássio e angiotensina II (estes 2 últimos mais importantes), sendo que, as concentrações plasmáticas de sódio e de peptídeo atrial natriurético também exercem alguma influência.

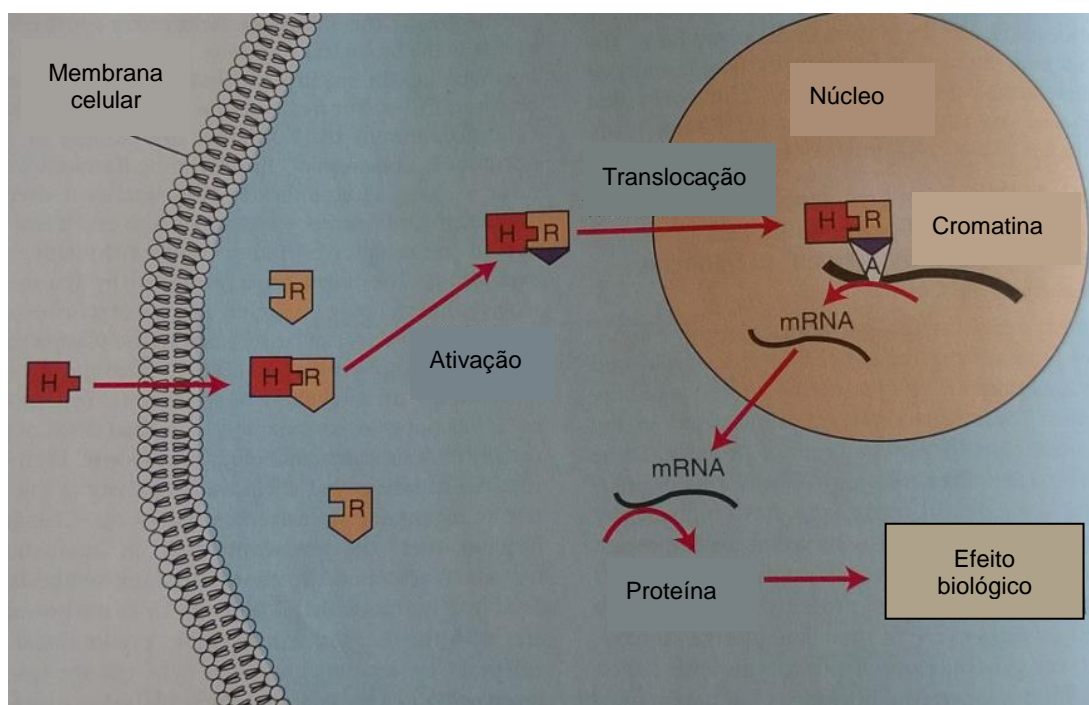
A produção de glucocorticoides inicia-se com a hidrólise dos ésteres de colesterol, os quais entram posteriormente para a mitocôndria da célula onde ocorre a clivagem enzimática da cadeia lateral da molécula dando origem a um esteroide C-21 (molécula com 21 carbonos), denominada de pregnenolona, a qual é convertida em 17-hidroxipregnenolona (pela enzima 17- α -hidroxilase) e sofre posteriormente uma série de modificações até à formação do

produto final – o Cortisol (Griffin & Ojeda, 2000). À semelhança dos mineralocorticoides, os glucocorticoides necessitam de se ligar a proteínas plasmáticas para serem transportados no sangue. Cerca de 75% do cortisol encontra-se ligado à transcortina (CBG), 15% à albumina e apenas 10% circula no sangue na forma livre e biologicamente ativa (Rijnberk et al., 2010). Depois de utilizado, o cortisol livre é rapidamente repostado por dissociação da hormona ligada a proteínas transportadoras, pelo que as concentrações totais não refletem apenas a taxa de secreção das hormonas, pois também podem ser influenciadas pela quantidade de proteínas plasmáticas ligantes de corticosteroides. O cortisol tem um tempo de semi-vida de 60 minutos e o seu metabolismo ocorre principalmente no fígado onde é convertido em tetrahydrocortisol, e depois conjugado com ácido glucorónico, tornando-se hidrossolúvel e entrando novamente na circulação para ser excretado na urina juntamente com uma percentagem adicional que é convertida em derivados 17-cetosteroides. Apenas 1 a 2% do total de cortisol secretado é excretado inalterado pela urina, pelo que o doseamento deste cortisol livre na urina reflete bem a sua produção corporal (Greco, 2013).

1.3. Mecanismo de ação e ações do cortisol

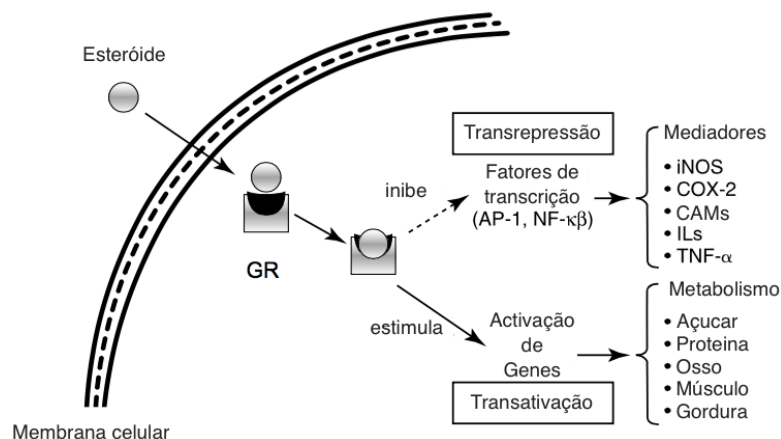
O sistema endócrino interatua com o sistema nervoso para coordenarem atividades que requerem um controlo rápido. Uma importante característica do sistema endócrino é a capacidade de amplificação do sinal. A ação de uma molécula esteroide para ativar um gene pode resultar na formação de muitas moléculas de ácido ribonucleico mensageiro (mRNA), e cada uma destas induz a formação de várias moléculas de enzima (e proteínas não enzimáticas), o que permite que uma pequena quantidade de hormona no plasma produza um efeito biológico significativo (Greco, 2013). Pode dizer-se então que o mecanismo de ação dos glucocorticoides centra-se na síntese de mRNA como representado nas Figuras 4 e 5 (Rijnberk et al., 2010). Uma vez capazes de atravessar a membrana plasmática celular, estes corticosteroides entram na célula por difusão simples e ligam-se a recetores citoplasmáticos específicos formando um complexo que é transferido para o núcleo (translocação) onde vai interagir com locais específicos na cromatina, denominados de Elementos Responsivos aos Glucocorticoides (Greco, 2013; Papich, 2015).

Figura 4 – Esquema representativo do mecanismo de ação das hormonas esteroides (Adaptado de Greco, 2013)



(H) hormona esteroide; (R) recetor intracelular; (A) local de ligação do complexo hormona-recetor na cromatina

Figura 5 – Esquema representativo da ação dos glucocorticoides (Adaptado de Papich, 2015)



A transrepressão é responsável pelos efeitos anti-inflamatórios dos glucocorticoides, uma vez que inibem os mediadores inflamatórios. Por outro lado, a transativação é responsável pelos efeitos metabólicos dos mesmos. (GR) Recetor glucocorticoide; (iNOS) Óxido nítrico sintetase induzível; (COX-2) Ciclooxigenase-2; (CAMs) Moléculas de adesão celular; (ILs) Interleucinas; (TNF-α) Fator de necrose tumoral α

A ação dos glucocorticoides nos tecidos-alvo não depende somente da taxa de produção e da ativação de GR. Nos tecidos-periféricos o cortisol é metabolizado antes da chegada ao recetor pela enzima 11 β -HSD, que catalisa a interconversão do cortisol (glucocorticoide ativo) em cortisona (glucocorticoide inativo), e que apresenta 2 isoformas. A tipo 1 (11 β -HSD1) amplamente distribuída em vários tecidos (fígado, gónadas e tecido adiposo) e que *in vivo* atua principalmente como uma redutase, convertendo a cortisona em cortisol; e a de tipo 2 (11 β -HSD2) que se encontra principalmente em tecidos-alvo dos mineralocorticoides (rins), atuando como desidrogenase e convertendo o cortisol em cortisona, inativando-o e protegendo os MR da ativação inapropriada pelos glucocorticoides. A expressão de ambas as isoenzimas é importante no controlo de ações específicas dos glucocorticoides em determinados tecidos (Rijnberk et al., 2010).

Uma das funções mais importantes dos glucocorticoides é o controlo do metabolismo, nomeadamente a estimulação da gluconeogénese hepática envolvendo a conversão de aminoácidos (derivados da degradação de proteínas) em carboidratos (Greco, 2013). O cortisol tem também algum efeito mineralocorticoide, embora com uma potência reduzida, e desempenha um papel na diurese aumentando a excreção de água na urina. Enquanto inibe a atividade da ADH no túbulo distal, o efeito mais importante é aumentar a taxa de filtração glomerular. Esta ação vai induzir a polidipsia e poliúria. É ainda responsável por estimular a secreção de ácido gástrico no estômago (Greco, 2013; Reece, Erickson, Goff, & Uemura, 2015). A exposição a qualquer tipo de *stress* provoca um aumento imediato da secreção de ACTH que induz o aumento em poucos minutos de cortisol. Este efeito é benéfico para o indivíduo já que induz a rápida mobilização de aminoácidos e de gorduras a partir das reservas celulares, tornando-os imediatamente disponíveis para a produção de energia e síntese de outros compostos, tais como a glucose, necessários aos vários tecidos do corpo (Hall, 2016). Estudos recentes demonstraram que o cortisol funciona como uma componente chave de alterações metabólicas em resposta a hormonas do *stress*. Uma teoria interessante acerca do papel fisiológico dos glucocorticoides na inflamação e imunidade sugere que a sua libertação ocorre no momento de algum *stress* imunitário ou inflamatório, atuando como um inibidor natural dos processos celulares que são ativados nestas situações. Deste modo o *stress*-induzido promove a libertação de glucocorticoides com uma função protetora, de modo a prevenir um “excesso” do normal processo de defesa ativado durante processos inflamatórios e de resposta imune (Kemppainen & Behrend, 1997). A inibição da expressão de genes é uma componente chave na ação dos glucocorticoides. Em células do sistema imunitário, os GR inibem a ação da proteína ativadora 1 (AP-1) e do fator nuclear kappa B (NF- κ B), os quais são fatores de transcrição que regulam a expressão de diversas vias de citocinas, tendo assim efeitos de inibição da resposta imunológica, como é representado na Figura 5 (Rijnberk et al., 2010; Papich, 2015).

1.4. Regulação e variações do cortisol

A regulação da produção de glucocorticoides é assegurada pelo eixo Hipotálamo-Hipófise quase exclusivamente pela concentração plasmática de ACTH (Rijnberk et al., 2010). A regulação da produção e libertação de ACTH tem início aquando da estimulação da hipófise por peptídeos produzidos na porção anterior do núcleo paraventricular do hipotálamo em resposta a estímulos centrais e periféricos (Xing et al., 2015). A ACTH é um polipeptídeo com 39 aminoácidos semelhante entre as diferentes espécies, sendo que a ACTH do cão difere num aminoácido na parte terminal-carboxil (Rijnberk et al., 2010). Esta molécula liga-se a recetores transmembranares de melanocortina 2 (MC2R) existentes especificamente na superfície das células adrenocorticais de modo a desencadear sinais intracelulares responsáveis pela síntese e libertação de glucocorticoides (Kemppainen & Behrend, 1997). Estes glucocorticoides vão aumentar rapidamente e induzir um mecanismo de retroalimentação negativo no eixo Hipotálamo-Hipófise ao nível dos neurónios hipotalâmicos e nas células corticotróficas adeno-hipofisárias, inibindo assim a libertação da hormona libertadora de corticotrofina (CRH) e ACTH (Herrtage, 2004; Rijnberk et al., 2010). A inibição da secreção basal de ACTH parece ser exercida através da ocupação dos MR presentes em grandes quantidades no cérebro e hipófise caninos (principalmente ao nível do complexo septo-hipocampal e lobo anterior da hipófise). Já os GR, principalmente envolvidos neste mecanismo de retroalimentação negativo dos glucocorticoides libertados em resposta ao *stress*, encontram-se mais uniformemente distribuídos no cérebro e a sua quantidade presente no lobo anterior hipofisário é duas vezes superior. A magnitude e duração da inibição está diretamente relacionada com a potência e duração do sinal por parte dos glucocorticoides (Kemppainen & Behrend, 1997).

A variação dos níveis de cortisol é influenciada por uma série de fatores (Rijnberk et al., 2010). Na maioria dos animais a CRH e ACTH apresentam secreção episódica e pulsátil, o que leva a flutuações na concentração de cortisol ao longo do dia (Kobelt, Hemsworth, Barnett, & Butler, 2003; Herrtage, 2004). A secreção de ACTH pode ocorrer antes ou concomitantemente com o aumento de cortisol, contudo podem ocorrer períodos de dissociação entre as concentrações destas duas moléculas, a qual é explicada pelo facto do eixo HHA ter 2 tipos diferentes de ativação, um que depende diretamente do núcleo supraquiasmático e que é responsável pelas variações circadianas hormonais, e o outro que depende da receção de um estímulo stressante. A inervação autónoma adrenal desempenha também um importante papel na variação do cortisol dissociada da variação da ACTH e da resposta das células adrenais a esta hormona (Castillo et al., 2009).

Em humanos, bem como em muitas outras espécies animais, a secreção de cortisol tem um ritmo circadiano diurno, isto é, concentrações maiores pela manhã e menores à noite. Contudo os estudos têm demonstrado que tanto no cão como no gato existe pouca ou nenhuma variação circadiana das concentrações plasmáticas de ACTH e de cortisol (Kemppainen & Behrend, 1997; Castillo et al., 2009; Rijnberk et al., 2010; Wenger-Riggenbach et al., 2010; Nelson, R. W., Turnwald, G. H., Willard, M. D., 2012; Papich, 2015). Caracterizam-se pela presença de uma média de 8 a 16 picos de libertação por dia (Kemppainen & Behrend, 1997). Castillo et al. (2009) demonstraram que tanto a variação da ACTH como de cortisol acompanham o comportamento do animal, correspondendo valores mais elevados a períodos de maior atividade, inversamente aos períodos de descanso. Já Herrtage (2004) e Giannetto et al. (2014) defendem a existência de oscilação circadiana no cão sincronizada pelo fotoperíodo, através do núcleo supraquiasmático, refletindo as características do sono desta espécie. No entanto, enquanto os primeiros autores referem que as concentrações de cortisol são maiores nas primeiras horas da manhã, os segundos concluem que as concentrações começam a aumentar no início do dia e atingem o pico a meio deste, diminuindo progressivamente para alcançar os menores valores durante a noite. Outros autores porém, apoiam a existência de uma oscilação circadiana na concentração de glucocorticoides em circulação, sendo maior no período da manhã (Kobelt et al., 2003). O *stress* é outro importante fator que faz variar as concentrações de cortisol, pois ao nível do SNC ele inicia uma resposta que conduz a um aumento da libertação de hormonas hipofisiotróficas (tais como a CRH), com o consequente aumento de cortisol em poucos minutos após o início do estímulo. A resposta é proporcional ao grau de *stress*, ou seja, baixos níveis de *stress* resultam numa produção de cortisol menor (Greco, 2013). O sistema imunitário através de citocinas pró-inflamatórias como a interleucina (IL)-1, a IL-6 e o fator de necrose tumoral (TNF)- α , também ativa o eixo HHA. A ação reguladora das citocinas é exercida predominantemente no hipotálamo, sendo a CRH o maior mediador da resposta. Também estas estão sujeitas à regulação de retroalimentação pelos glucocorticoides, o que resulta numa diminuição da resposta do hipotálamo para a ativação das mesmas e um bloqueio da sua produção nos macrófagos. Além destes mecanismos de controlo existem outros que são independentes da ACTH e que influenciam a libertação de corticosteroides, tais como a regulação parácrina intra-adrenal (Rijnberk et al., 2010). Torna-se ainda importante referir que, aquando da administração crónica de glucocorticoides, ocorre uma supressão na transcrição do gene POMC, diminuindo as reservas de ACTH nas células corticotróficas, o que leva à atrofia bioquímica da unidade Hipotálamo-Hipófise. Consequentemente a libertação de ACTH diminui, conduzindo progressivamente à atrofia das duas zonas mais internas do córtex da glândula adrenal. Contudo em situações de *stress* prolongado, mesmo quando a secreção é muito elevada, não ocorre atrofia do eixo, pois os peptídeos hipotalâmicos estimulam positivamente, contrabalançando assim o

estímulo negativo do aumento de glucocorticoides (Kemppainen & Behrend, 1997). Estudos recentes indicam que o eixo Hipotálamo-Hipófise se encontra mais ativo em cães mais velhos, estando os valores basais de ACTH e cortisol mais elevados. Devido à sensibilidade do córtex da glândula adrenal à ACTH, um pequeno aumento desta hormona é rapidamente refletido num aumento de glucocorticoides (em poucos minutos). A concentração sanguínea de cortisol pode ainda variar em casos patológicos aquando de doenças que afetam o eixo HHA. Na Tabela 1 encontram-se referidas diversas causas que levam a variações na concentração plasmática de cortisol em cães e gatos.

Tabela 1 - Causas de alteração da concentração plasmática de cortisol em cães e gatos (Adaptada de Nelson et al, 2012)

AUMENTO	DIMINUIÇÃO
Stress, medo, excitação, agressão	Armazenamento inadequado das amostras
Doença crónica ou grave	Hiperadrenocorticismio iatrogénico
Fármacos: cortisona, hidrocortisona, prednisona, prednisolona, anticonvulsivos	Tumor adrenal secretor de progesterona
Hiperadrenocorticismio	Hipoadrenocorticismio
Administração de estrogénios	Fármacos: progestagénios, androgénios*, glucocorticoides*
	Doença aguda crítica

* administração crónica

1.5. Doseamento do cortisol

Atualmente vários tipos de amostras biológicas são utilizadas para o doseamento do cortisol, desde sangue, saliva, até ao pelo (Bennett & Hayssen, 2010). Utiliza-se frequentemente o radioimunoensaio (RIA) e a enzaimunoensaio (EIA) ou imunoensaio quimioluminescente (Nelson et al, 2012). No cão as concentrações plasmáticas de cortisol total variam de 1,00 a 6,00 µg/dL (Nelson et al, 2012). Consequentemente as de cortisol livre vão de 0,05 a 0,76 µg/dL, sendo esta a fração biologicamente ativa devido à sua facilidade de acesso ao interior das células-alvo e ligação aos recetores do tipo II (Kemppainen & Behrend, 1997). A colheita de sangue pode causar algum *stress* ao animal, aumentando a concentração cortisol em 3 minutos após a contenção (Kobelt et al., 2003). A partir da amostra colhida, o cortisol pode ser doseado no soro ou no plasma com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), sendo que a concentração é mais estável neste último e em amostras frias (Stockham & Scott, 2002). O soro pode ser obtido logo após a colheita e

refrigerado ou congelado até à realização da análise, podendo as amostras permanecer até 6 horas em gelo sem que ocorram alterações no cortisol. Repetidos congelamentos e descongelamentos, hemólise das amostras, ou jejum de mais de 36 horas também não alteram a concentração desta hormona (Steiss, Schaffer, Ahmad, & Voith, 2007).

Na urina a concentração de cortisol aumenta com o aumento da sua libertação plasmática, demorando aproximadamente 3 horas até atingir o seu valor máximo, sendo que a colheita pode revelar-se difícil (Bennett & Hayssen, 2010). O doseamento é obtido pela realização do rácio cortisol:creatinina urinários, na urina colhida pelo proprietário numa amostra da manhã, durante 3 dias. Esta concentração reflete a libertação de várias horas, estando assim ajustada para flutuações na sua concentração plasmática (Ramsey & Herrtage, 2005). Uma vez que os valores na urina são resultado de uma produção de longos períodos, não estão suscetíveis a variações causadas pelas secreções pulsáteis de cortisol (Stockham & Scott, 2002). Os valores de referência para cães saudáveis são $<10 \times 10^{-6}$ (Ramsey & Herrtage, 2005).

O doseamento de cortisol na saliva é considerado um método não-invasivo e tolerado pela maioria dos animais domésticos, necessitando apenas de contenção leve a moderada. Contudo o temperamento do animal em causa vai determinar a perceção do grau de invasão. O cortisol salivar encontra-se positivamente relacionado com o cortisol plasmático e são necessários 4 minutos até que os efeitos da contenção sejam refletidos na sua concentração ao nível da saliva (Ng et al., 2014). A colheita típica é realizada com uma corda dental de algodão colocada na boca do cão durante 1 a 2 minutos. A saliva é posteriormente extraída da corda saturada por compressão, através de uma seringa ou por centrifugação num dispositivo Salivette® (tubos plásticos com algodão, específicos para colheita de saliva). Pode recorrer-se a um algodão embebido em ácido cítrico, que se passa na língua do cão, com o objetivo de aumentar salivação. As esponjas oftálmicas cirúrgicas de hidrocélulose são bons absorventes e parecem ser um material útil para a colheita. No entanto é importante que as esponjas permaneçam na boca do animal tempo suficiente para permitir a sua completa saturação, por forma a obter um volume de amostra adequado. Normalmente a quantidade de saliva colhida é de 0.1 a 0.5 ml e estudos recentes referem a necessidade de volumes muito pequenos (25 μ l) para a realização da análise. As amostras devem ser conservadas congeladas à temperatura de -20°C (Sandri, Colussi, Perrotta, & Stefanon, 2015).

Nas fezes, o doseamento de cortisol apresenta algumas limitações, pois pode levar mais de 3 horas até atingir a concentração máxima, já que os corticosteroides não estão uniformemente distribuídos no conteúdo fecal e, inclusive, podem estar inversamente

relacionados com a produção de fezes. Há ainda o risco de contaminação cruzada pelo ambiente (Bennett & Hayssen, 2010). No entanto tem a vantagem de a colheita induzir pouco *stress* ao animal (ainda menos que a colheita de saliva em animais não treinados) (Accorsi et al., 2008).

Atualmente têm sido realizados estudos acerca do doseamento desta hormona no pelo já que o folículo piloso, para além de fonte local de cortisol, tem ainda ligação direta com o sistema nervoso. No entanto torna-se difícil perceber se o cortisol doseado no pelo é de origem sistémica, local ou ambas (Accorsi et al., 2008). Um estudo recente demonstrou que a concentração de cortisol no pelo varia do mesmo modo que na saliva, tornando assim esta amostra válida no doseamento da concentração de cortisol basal. Trata-se de uma amostra indicada para análise de *stress* crónico, já que no folículo piloso ocorre acumulação hormonal por um período de tempo, esta pode ser doseada através da tricotomia e recrescimento de pelos em tempo controlado (Bennett & Hayssen, 2010). A colheita é relativamente fácil de realizar; sem riscos à saúde do animal; fácil de conservar; não é afetada pelo contacto com água e é insensível a alterações por *stress* agudo, tais como a contenção (Accorsi et al., 2008).

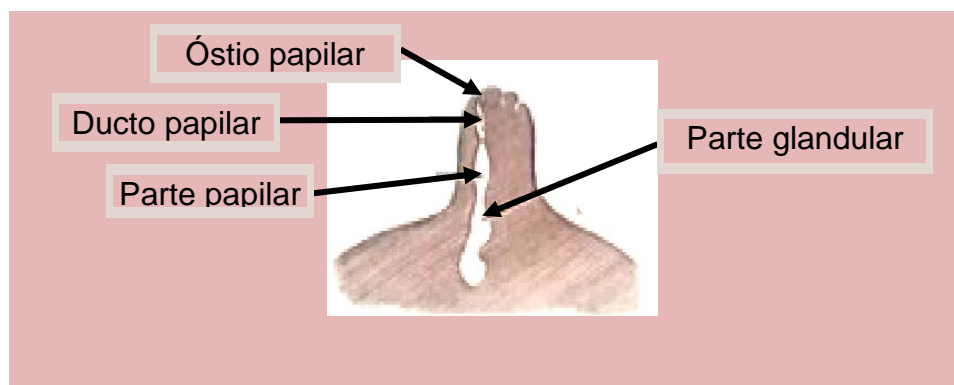
2. ONCOLOGIA DA GLÂNDULA MAMÁRIA

2.1. Anatomia e embriologia da mama

A glândula mamária evoluiu no tempo quando o aumento do cuidado materno em neonatos se tornou necessário para garantir a sobrevivência da espécie, através da secreção leite, inicialmente colostro (produzido imediatamente após o parto e importante para a transferência de imunidade passiva ao recém-nascido), para alimentar a cria. Tem origem embriológica na crista mamária (2 espessamentos da ectoderme) na região ventral do embrião desde a zona axilar à inguinal, e encontra-se bem desenvolvida (cerca de 19 mm) aos 30 dias do embrião canino (Dyce, Sack, & Wensing, 2010; Evans & Miller, 2013). Esta crista forma pequenos “botões” epiteliais que se desenvolvem no mesênquima subjacente, formando perto do nascimento os ductos lactíferos (ou papilares) (8 a 14 na cadela) e alvéolos. Aquando do nascimento ocorre em redor dos botões epiteliais uma proliferação do mesênquima para formar o mamilo na superfície corporal (Sadler & Langman, 2004; Dyce et al., 2010). Também nos embriões machos ocorre a formação de botões mamários, dando origem aos mamilos rudimentares na face ventral do tronco. As glândulas mamárias são definidas como glândulas sudoríparas muito aumentadas e altamente modificadas, compostas de glândulas túbulo-alveolares e apócrinas (Fossum et al., 2007). O epitélio

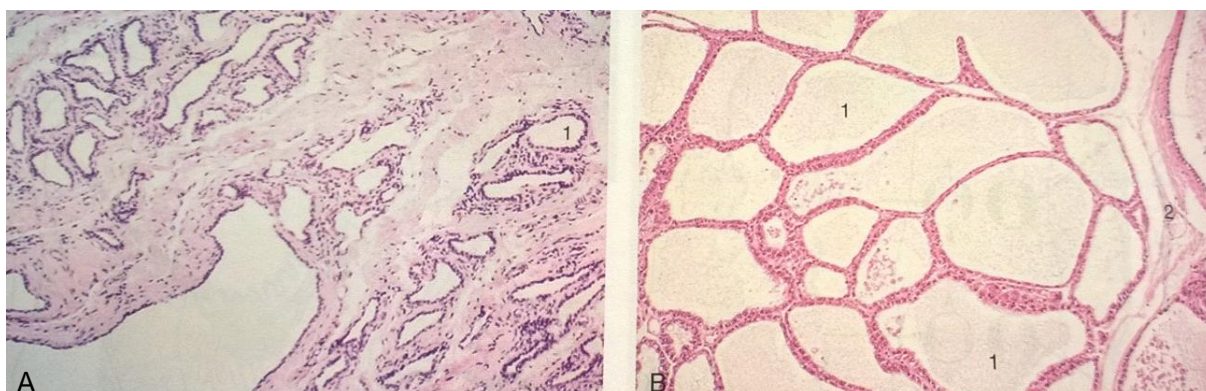
destas glândulas é composto por uma única camada interna de células epiteliais luminiais polarizadas, e outra camada exterior de células mioepiteliais, separada do estroma intralobular por uma membrana basal rica em laminina. As células mioepiteliais são células contrácteis de origem ectodérmica, localizadas tanto nas unidades secretoras (camada descontínua), como nos ductos excretores (camada contínua) (Sánchez-Céspedes et al., 2015). A secreção (do leite) é sintetizada em células epiteliais especializadas e organizadas em alvéolos, sendo libertada num sistema de ductos (intralobular e interlobular maior) que a dirige para um seio lactífero (com uma parte glandular e outra papilar, retratadas na Figura 6) que se continua pelo ducto papilar, o qual se abre no óstio papilar do ápice do mamilo circundado por um esfíncter de musculatura lisa (Dyce et al., 2010).

Figura 6 – Esquema representativo da anatomia do sistema do seio lactífero (Adaptado de Evans & Miller, 2013)



Cada lóbulo glandular encontra-se separado dos que o rodeiam por septos de tecido conjuntivo. Cada ducto papilar ocupa cerca de 1/3 do comprimento do mamilo e está revestido por epitélio pavimentoso estratificado que transita para epitélio colunar perto da margem do seio papilar e para epitélio secretor nos alvéolos. Com a proximidade da puberdade, sob o controlo da prolactina, GH, fator de crescimento semelhante à insulina (IGF) e outros fatores, os ductos ramificam-se (McGavin & Zachary, 2007). Uma vez que o tecido secretório está presente apenas durante a gestação, pseudogestação, lactação e 40 a 50 dias pós-desmame, é no auge da lactação que as glândulas mamárias se encontram totalmente desenvolvidas e funcionais, apresentando-se aumentadas de tamanho. Imagens histológicas de uma secção de glândula mamária, na fase lactante e não-lactante, estão representadas na Figura 7. Depois do período pós-parto o parênquima regride e os alvéolos e os lóbulos são reduzidos a um estreito sistema de ductos com poucos lóbulos remanescentes. Contudo nunca retorna por completo ao tamanho anterior e aumenta sempre um pouco mais a cada gestação (Dyce et al., 2010).

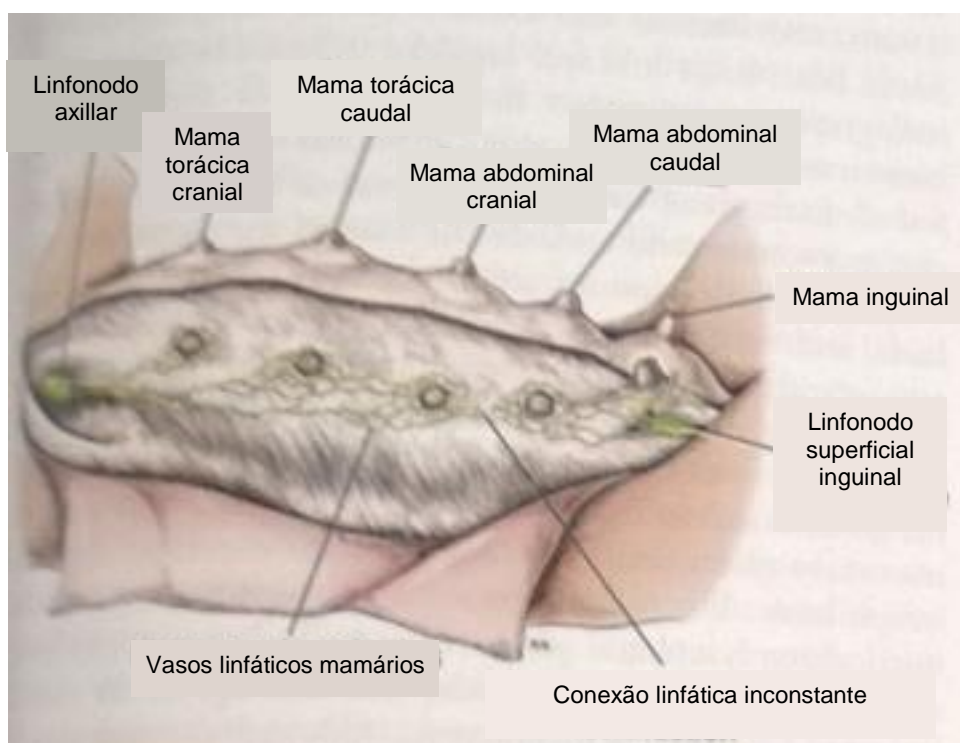
Figura 7 – Microfotografia com ampliação de 70x de glândulas mamárias túbulo-alveolares compostas (Dyce et al., 2010)



(A) não lactante; (B) lactante; (1) alvéolo; (2) septo interlobular

Em regra, a cadela apresenta 5 glândulas mamárias em cada cadeia (2 torácicas, 2 abdominais e 1 inguinal), e cada glândula tem o seu próprio plexo de canais linfáticos que se anastomosam e rodeiam a base do mamilo, como representado na Figura 8. Alguns canais principais (1 a 3) deixam cada plexo da glândula e passam superficialmente para o linfonodo mais próximo. Enquanto as mamas torácicas drenam diretamente nos linfonodos axilares, que por sua vez drenam, pelos linfonodos esternais, na cavidade torácica; as mamas abdominais caudais drenam na “malha” linfática da mama inguinal, bem como diretamente nos linfonodos inguinais superficiais, onde também drenam as glândulas mamárias inguinais. Estes linfonodos, por sua vez, vão drenar nos linfonodos ilíacos através dos vasos linfáticos do canal inguinal. As glândulas abdominais craniais drenam (a maior parte das vezes) nos linfonodos axilares, mas os seus vasos linfáticos podem também juntar-se ao da mama abdominal caudal e ir drenar nos inguinais superficiais (McGeady, J., S., & Ryan, 2006; Dyce et al., 2010) . A drenagem linfática de cada lado é inconstante e pode, por vezes, interconectar-se. Contudo não é consensual a existência de conexões linfáticas entre cadeias esquerda e direita (Fossum et al., 2007). Schlotthauer (1952) postulou ainda que podem existir ligações diretas entre os vasos linfáticos da mama e o sistema vascular, contribuindo para as metástases internas de tumores (Evans & Miller, 2013).

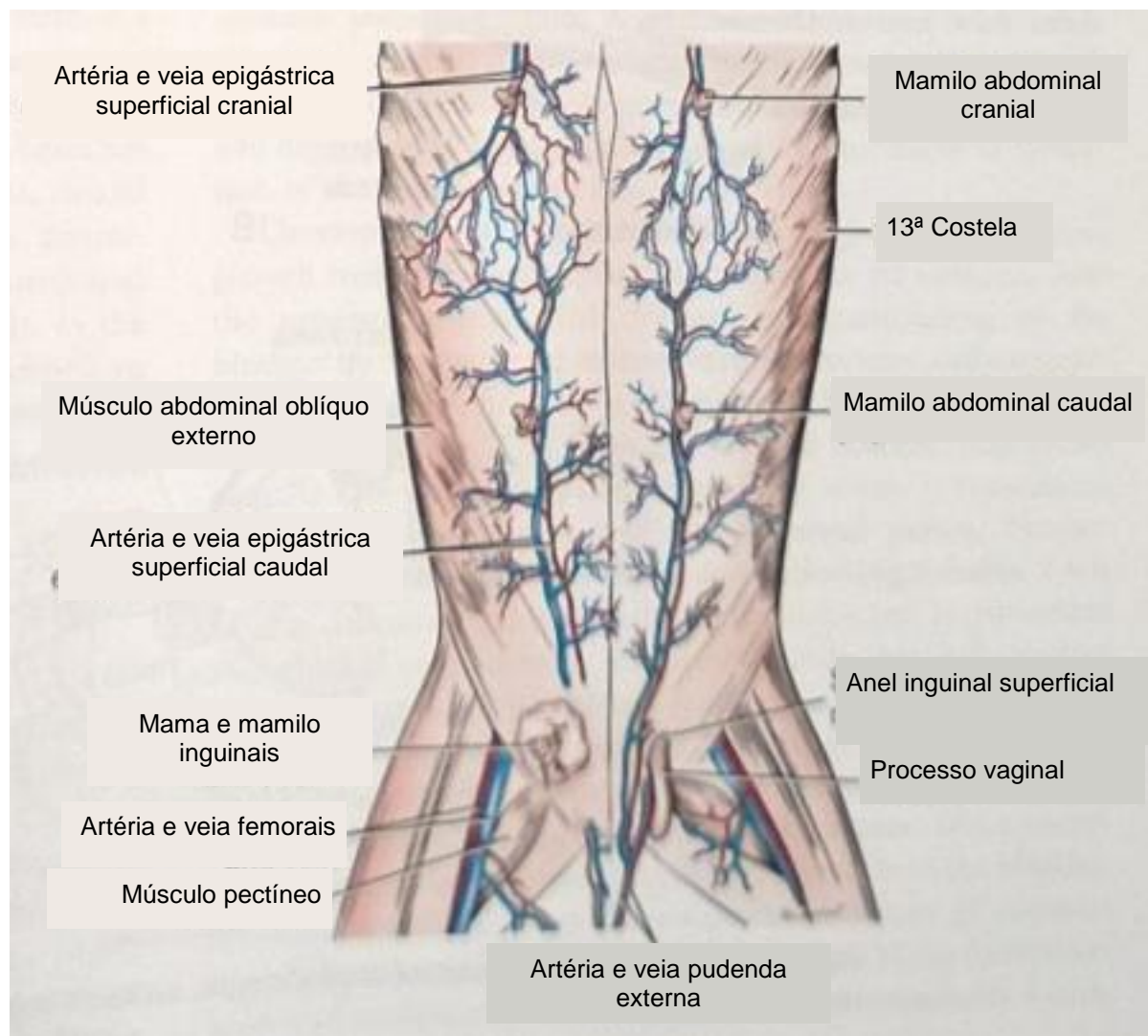
Figura 8 – Esquema representativo da topografia e rede linfática das glândulas mamárias da cadela (Adaptado de Evans & Miller, 2013)



As glândulas mamárias são altamente vascularizadas. O suprimento arterial das mamas torácicas é efetuado pelos ramos perfurantes craniais das artérias torácicas internas, que penetram a parede torácica através dos espaços intercostais, e pelas artérias intercostal e torácica lateral (Evans & Miller, 2013). Por outro lado, as glândulas abdominais e inguinais são supridas pelos ramos mamários das artérias epigástricas superficiais, como pode ser observado na Figura 9. A cranial (um ramo da artéria torácica interna) penetra o músculo reto abdominal a 2-4 cm da linha média, medial ao arco costal, e emite ramos para as glândulas mamárias abdominais craniais. A caudal (um ramo da artéria pudenda externa) segue cranialmente sobre a superfície do músculo reto abdominal, aprofunda na zona das glândulas inguinais para supri-las e continua cranialmente para suprir as mamas abdominais caudais, terminando em numerosos ramos superficiais que anastomosam com os ramos terminais da artéria epigástrica superficial cranial (Fossum et al., 2007; Evans & Miller, 2013). As veias, por norma, seguem um curso paralelo às artérias. As glândulas torácicas drenam na veia epigástrica superficial cranial e também nas veias torácicas internas, ao nível do 5º espaço intercostal. As glândulas mamárias abdominais e inguinais drenam na veia epigástrica superficial caudal.

A inervação das mamas torácicas craniais é assegurada pelos 4º, 5º e 6º ramos cutâneos laterais dos nervos intercostais (ramos ventrais do nervo torácico), enquanto as torácicas caudais são inervadas pelos 6º e 7º ramos dos mesmos nervos. Já as mamas abdominais e inguinais são inervadas pelo nervo genitofemoral e ramos cutâneos ventrais dos primeiros 3 nervos lombares (iliohipogástrico cranial, iliohipogástrico caudal e ilioinguinal). Além de sujeita ao controlo nervoso, a secreção mamária é ainda influenciada por hormonas da hipófise e outros órgãos, trazidas pela corrente sanguínea (Fossum et al., 2007; Evans & Miller, 2013).

Figura 9 – Esquema representativo dos vasos sanguíneos das últimas 3 glândulas mamárias (Adaptado de Evans & Miller, 2013)



2.2. Oncobiologia

As doenças oncológicas representam um problema comum na clínica de pequenos animais, sendo o tumor de mama uma das maiores causas de morte reportada em animais geriátricos (Dobson & Lascelles, 2011). Numa célula normal os processos fundamentais como nascimento, divisão, proliferação, diferenciação e migração celulares são cuidadosamente controlados, havendo um balanço entre o nascimento e a morte das células, de modo a que cada perda ou ganho, seja o apropriado. Qualquer falha nestes processos pode conduzir à proliferação descontrolada, perda da capacidade de morte celular ou qualquer outra proliferação anormal, levando a um fenótipo maligno (Baines, 2013). Uma neoplasia é caracterizada como um “novo crescimento” anormal de tecido, que se desenvolve mais rapidamente do que os tecidos adjacentes normais e de uma forma persistente e descontrolada, podendo ser benigna ou maligna (frequentemente denominada de cancro). O termo tumor tende a ser genericamente usado para descrever qualquer massa, seja ela benigna ou maligna, diferenciando-se por uma série de características indicadas na Tabela 2 (Euler, 2011).

Tabela 2 - Diferenças nas características de tumores benignos e malignos (Adaptada de Euler, 2011)

CARACTERÍSTICAS	TUMOR BENIGNO	TUMOR MALIGNO
Taxa de crescimento	Relativamente lento. Pode cessar em alguns casos.	Frequentemente rápido. Raramente cessa crescimento.
Tipo de crescimento	Expansivo. Normalmente limites bem definidos. Podem tornar-se encapsulados.	Invasivo. Limites mal definidos com os tecidos adjacentes normais.
Efeitos nos tecidos adjacentes	Mínimos. Podem causar necrose por pressão e deformação anatómica.	Graves. Crescimento e invasão tumorais resultam em destruição dos tecidos adjacentes normais.
Metastização	Não ocorre.	Ocorre por via linfática e hematogénica, e propagação transcelómica.
Efeitos no hospedeiro	Mínimos. Risco de vida quando se desenvolve num órgão vital (cérebro por exemplo).	Frequentemente coloca a vida do animal em risco pelo seu crescimento destrutivo e disseminação de metástases para outros órgãos (vitais).

Os passos que conduzem à transformação neoplásica de uma célula não estão ainda completamente compreendidos, mas envolvem a interrupção da função de genes que controlam o crescimento e a diferenciação celular (Euler, 2001). Os proto-oncogenes, por excesso de produção de fatores de crescimento ou de estimulação do crescimento celular, vão exercer uma ação aberrante ou excessiva que promove o crescimento neoplásico. Já os genes supressores de tumores, cuja ação normal é evitarem a proliferação de células geneticamente modificadas, quando inativados por mutações, ocorre a perda de proteínas supressoras com consequente falha no bloqueio de crescimento inapropriado e multiplicação de células geneticamente modificadas (Euler, 2011). No entanto estas mutações são recessivas, necessitando de ambos os alelos serem inativados para inibir a atividade do gene. Por vezes estes genes podem ser alterados indiretamente por alterações genéticas que ocorrem em genes reparadores de DNA, os quais se tornam incapazes de realizar a sua função normal, promovendo a acumulação de secções de DNA alterado, algumas das quais podem ser importantes para o crescimento celular (Morris & Dobson, 2001). Formas alteradas de outras classes de genes também podem participar na carcinogénese permitindo, por exemplo, que as células se tornem invasivas ou capazes de metastizar (Euler, 2011). A acumulação destas alterações conduz à rutura de vários mecanismos celulares e a um fenótipo celular alterado, caracterizado pela aquisição de certas características tumorais que as diferenciam das células normais: 1) autossuficiência em sinais de crescimento (levando a uma proliferação descontrolada independentemente da necessidade de novas células); 2) o processo de diferenciação encontra-se debilitado nestas células, que são frequentemente imaturas; 3) insensibilidade a sinais de anti-crescimento; 4) potencial de replicação ilimitado; 5) resistência à apoptose (associada à diminuição da expressão de proteínas pro-apoptóticas e aumento de anti-apoptóticas); 6) angiogénese sustentada; 7) capacidade em escapar à destruição pelo sistema imunitário; e 8) capacidade de invasão de tecidos e metastização (Morris & Dobson, 2001; Euler, 2011; Baines, 2013; Santos & Matos, 2015).

Investigações recentes demonstraram que as células tumorais também desencadeiam alterações no seu microambiente, quer pela degradação direta dos componentes da matriz extracelular, quer pela ativação de fibroblastos e células imunitárias (Santos & Matos, 2015). Embora seja elevada a quantidade de alterações genéticas que podem ocorrer durante a carcinogénese, apenas um número limitado de vias estão realmente envolvidas e a expressão anormal da ciclooxigenase-2 (COX-2) afeta muitas dessas vias. A sobreexpressão desta enzima, normalmente ausente em células normais, e consequente aumento de prostaglandina E₂ (PGE₂), pode ser induzida por fatores de crescimento, reações inflamatórias, promotores tumorais e oncogenes, ocorrendo assim em muitas neoplasias

(Teske, 2010). Também a ciclooxygenase-1 (COX-1) tem sido demonstrada em neoplasias mamárias malignas e benignas, muito embora apenas a COX-2 revela um valor prognóstico, estando envolvida no desenvolvimento e progressão de tumores (Queiroga, Alves, Pires, & Lopes, 2007; Queiroga, Pires, Lobo, & Lopes, 2010). Este mecanismo não se encontra ainda completamente esclarecido, no entanto a sobreexpressão da COX-2, possivelmente induzida pelo microambiente tumoral hipóxico, tem sido associada à: 1) capacidade de invasão e metastização tumorais; 2) resistência à apoptose de células neoplásicas; 3) evasão a sinais de anti-crescimento através do bloqueio da diferenciação normal por ativação da β -catenina (um proto-oncogene); e 4) potenciação da angiogénese por indução da produção de fatores como o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) (Queiroga et al., 2010; Teske, 2010; Cash et al., 2015). Os tumores podem ainda resultar de alterações hereditárias, através de um gene anormal presente na linha germinal, tais como mutações nos genes BRCA1 (gene de suscetibilidade ao cancro de mama), BRCA2, e p53 associadas a neoplasias mamárias (Dobson & Lascelles, 2011).

2.3. Neoplasias mamárias

2.3.1. Epidemiologia e Etiologia

As neoplasias mamárias são as segundas neoplasias mais comuns em cães, sendo mais frequentes em animais idosos (média de 10 anos de idade) e fêmeas inteiras ou esterilizadas após vários ciclos éstricos. Estudos recentes referem que 70% do total das neoplasias em cadelas inteiras são mamárias, e que estas são 62 vezes mais predispostas do que os machos (predominantemente benignos nestes). Nesta espécie 50% são malignos e metade destes metastizam. Todas as raças podem ser afetadas, no entanto algumas têm sido reportadas como predispostas: Poodle toy e miniatura; English springer spaniel; Brittany spaniel; Cocker spaniel; Puli; Setter inglês; Pointer; Pastor alemão; Bichon maltês; Yorkshire terrier; Teckel; Boston terrier; Fox terrier; Airedale terrier; Great pyrenes; Samoiedo; Keeshonden (Fossum et al., 2007).

O estímulo por hormonas sexuais aumenta o risco de desenvolvimento de tumores mamários sendo que a OVH precoce reduz grandemente esse risco. Quando realizada antes do primeiro cio fica reduzido para 0.05%, entre o primeiro e segundo cios o risco aumenta para 8%, e depois deste cio o risco sobe já para os 26%. Tem ainda sido discutida a importância da OVH mesmo em animais que desenvolvem neoplasia mamária, sendo que quando realizada antes dos 2 anos de idade a longevidade pós-cirurgia é maior, quando comparada com cadelas inteiras ou esterilizadas com mais de 2 anos (Dobson & Lascelles, 2011). A administração de progestagénios (acetato de medroxiprogesterona, acetato de

megestrol e acetato de clormadinona) pode estar associada ao desenvolvimento de neoplasias benignas em cães (Fossum et al., 2007; Morris & Dobson, 2001). Cães com neoplasia mamária benigna apresentam um risco 3 vezes maior de desenvolver neoplasia maligna (Fossum et al., 2007). A obesidade em animais jovens, bem como o consumo de dietas caseiras, têm sido associadas a um maior risco de desenvolvimento destes tumores, sendo que a utilização de dietas ricas em proteína diminui a suscetibilidade (McGavin & Zachary, 2007).

2.3.2. Patogénese

Evidências recentes sugeriram que as células mioepiteliais normais diferem na morfologia, padrão de crescimento e níveis de expressão de citoqueratina, em comparação com as células mioepiteliais derivadas de tumor. As células cancerígenas também produzem diversos fatores de crescimento como o fator transformador de crescimento- β (TGF- β) e o fator de crescimento de fibroblastos (FGF), os quais recrutam e ativam fibroblastos e células estaminais derivadas da medula óssea, transformando-os nos chamados fibroblastos associados ao cancro (CAFs), que promovem a formação do ambiente de suporte tumoral. Em tumores mamários de humanos têm sido documentados valores elevados de CAFs e a sua presença associada a piores resultados clínicos. Os CAFs secretam nutrientes essenciais à sobrevivência das células tumorais; promovem um estado de inflamação crónica no microambiente tumoral através da secreção de citocinas pró-inflamatórias, induzindo a transição epitelial-mesenquimal das células tumorais e remodelação da matriz extracelular; estimulam ainda a angiogénese e inibem células imunitárias citotóxicas, contribuindo para a sobrevivência e proliferação das células tumorais (Santos & Matos, 2015).

Em geral a classificação neoplásica é baseada na histogénese, ou seja, no tecido de origem das células que formam o tumor. Deste modo, as neoplasias mamárias em cães podem ser compostas por células epiteliais, mioepiteliais ou tecido conjuntivo intersticial sendo que, quando presentes mais do que um destes componentes numa mesma neoplasia, as classificações mais frequentemente citadas reconhecem tumores epiteliais, mistos e mesenquimais. Os tumores epiteliais podem ser simples (apenas células epiteliais ou mioepiteliais) ou complexos (ambos os tipos de células), enquanto os mistos são compostos por células epiteliais e/ou mioepiteliais e ainda mesenquimais (Morris & Dobson, 2001; Sánchez-Céspedes et al., 2015). Os tumores mamários podem ainda ser agrupados em 2 grandes grupos, os benignos e os malignos, com diferentes frequências de incidência em cães, como se encontra descrito na Tabela 3. No entanto, focos malignos podem também ser encontrados em neoplasias benignas (Dobson & Lascelles, 2011).

Tabela 3 - Tipos histológicos e frequência dos diferentes tumores mamários em cães (Adaptada de Goldschmidt, Pena, Rasotto, & Zappulli, 2011; e Morris & Dobson 2001)

TIPO DE NEOPLASIA	FREQUÊNCIA RELATIVA (%)
EPITELIAIS MALIGNOS	49,0
Carcinoma <i>in situ</i>	—
Carcinoma simples	—
Tubular	—
Tubulopapilar	—
Cístico-papilar	—
Cribiforme	—
Carcinoma micropapilar invasivo	—
Carcinoma sólido	16,9
Comedocarcinoma	—
Carcinoma anaplásico	4,0
Carcinoma proveniente de adenoma complexo / tumor misto	—
Carcinoma complexo	—
Carcinoma e mioepitelioma maligno	—
Carcinoma de tipo misto	—
Carcinoma ductal	—
Carcinoma intraductal papilar	—
Carcinomas de tipos especiais	—
Carcinoma adenoscamoso	—
Carcinoma de células escamosas	—
Carcinoma mucinoso	—
Carcinoma rico em lípidos	—
Carcinoma de células fusiformes	—
Carcinoma inflamatório	—
MESENQUIMAIS MALIGNOS – SARCOMAS	3,1
Fibrossarcoma	—
Osteossarcoma	—
Condrossarcoma	—
Hemangiossarcoma	—
Outros sarcomas	—
CARCINOSSARCOMA – MALIGNO MISTO	1,0
BENIGNOS	51,0
Adenoma simples	5,0
Adenoma intraductal papilar (papiloma ductal)	—
Adenoma ductal (adenoma basalóide)	—
Adenoma complexo (adenomioepitelioma)	—
Fibroadenoma	—
Fibroadenoma de baixa celularidade	45,5
Fibroadenoma de alta celularidade	—
Tumor benigno misto	—
Mioepitelioma	—
NÃO CLASSIFICADOS	—
HIPERPLASIA / DISPLASIA MAMÁRIAS	—
Alteração fibroadenomatosa	—
Hiperplasia lobular (adenose)	—
Epiteliomose	—
Papilomatose	—
Ectasia ductal	—
Ginecomastia	—

Múltiplos tumores no mesmo indivíduo têm muitas vezes diferentes graus histopatológicos e podem ocorrer na mesma glândula ou afetar diferentes glândulas do mesmo animal. Um diagnóstico histopatológico preciso pode ajudar no estabelecimento do prognóstico, das opções de tratamento e da abordagem de uma determinada neoplasia mamária (Dobson & Lascelles, 2011). Alguns cães com estadió IV podem ainda desenvolver síndromes paraneoplásicas, tais como diátese hemorrágica ou CID (pouco frequentes), sendo que a maioria apresenta anormalidades hemostáticas subclínicas (Morris & Dobson, 2001).

2.4. A clínica do doente com neoplasia mamária

Os objetivos da avaliação inicial são diagnosticar o tipo histológico e grau da doença; determinar a extensão e o estadió de desenvolvimento; e investigar a existência de doenças concomitantes ou complicações relacionadas ao tumor (síndromes paraneoplásicas) (Morris & Dobson, 2001). A anamnese é importante pois, muitas neoplasias são descobertas durante o exame físico de rotina, e não por estímulo iatrogénico específico (Fossum et al., 2007). O exame físico deve avaliar várias características como a localização e relação do tumor com as estruturas anatómicas normais, o seu tamanho e volume, a mobilidade do tumor relativamente ao tecido mamário (sendo que a fixação normalmente indica infiltração tumoral e pior prognóstico), a existência de hiperplasia mamária (pode ser indicador de pseudogestação ou tumor ovário produtor de hormonas), se há ou não eritema cutâneo, aumento de temperatura, ulceração (indicativa de infiltração e rutura da epiderme) e/ou edema linfático, estes últimos indicadores de maior malignidade e característicos de neoplasias mamárias do tipo carcinoma anaplásico (Dobson & Lascelles, 2011). Os tumores mamários são normalmente fáceis de detetar à palpação como nódulos discretos ou não, presentes no interior da glândula, podendo ser únicos ou múltiplos. A maioria é móvel, mas podem ocasionalmente estar aderentes à fáscia subjacente ou ao músculo. Podem ser sésseis ou pedunculados, sólidos ou quísticos, ulcerados ou não. A presença de edema, ulceração, dor na região mamária, anorexia, fraqueza e perda de peso nos doentes, podem ocorrer em alguns carcinomas inflamatórios agressivos. Deve suspeitar-se deste tipo de neoplasias mamárias ou mastite caso as glândulas se apresentem edemaciadas e com pouca demarcação entre os tecidos anormal e normal (Morris & Dobson, 2001; Fossum et al., 2007). Alterações respiratórias surgem quando a doença está avançada, e são sinónimo de metastização pulmonar. No cão, as glândulas mais frequentemente afetadas são os 2 pares caudais. Pode ainda palpar-se um aumento dos linfonodos axilares e inguinais, bem como dos sublombares ao exame retal (Fossum et al., 2007).

O diagnóstico e estadiamento são importantes para estabelecer um prognóstico. O diagnóstico pode ser histológico através da biópsia de tecidos, sendo um método preciso uma vez que examina células, arquitetura e relação com os tecidos adjacentes normais. A realização de PAAF, apesar de ser um método rápido e simples de executar, somente oferece informação acerca da população e morfologia das células individuais, com pouco valor na previsão da malignidade, mas sendo um método útil para avaliar a disseminação de metástases nos linfonodos regionais (Dobson & Lascelles, 2011).

Com base no sistema TNM (Tabelas 4 e 5), em que tumores múltiplos são avaliados independentemente, pode definir-se o estadiamento clínico que é importante para o estabelecimento de um prognóstico. A letra T associa-se ao tumor primário, sendo importante definir a sua extensão com a maior precisão possível de modo a estabelecer margens de tratamento seguras, e realizar o exame físico como já descrito anteriormente. Pode ainda fazer-se uso de métodos complementares de diagnóstico tais como radiografia, ecografia e biópsia. A letra N relaciona-se com os linfonodos locais e regionais, e deve avaliar a presença de metástases, através do exame físico dos linfonodos (tamanho, forma, textura e mobilidade) sendo que quando estão aumentados, irregulares, firmes e fixos são indicadores de metastização. A letra M indica metástases à distância, e deve ter-se em conta a anamnese e o exame físico do doente. Uma vez que 25% a 50% dos cães com neoplasia mamária maligna revelam no momento do diagnóstico metástases pulmonares, é recomendada a realização de 3 planos radiográficos ao tórax do animal. No entanto, este exame apenas deteta metástases maiores que 0,5-1 cm de diâmetro, não podendo ser excluída a hipótese da existência de micro-metástases. A realização de tomografia computadorizada (TC) e ressonância magnética (RM) podem facilitar a avaliação de neoplasias invasivas e doença metastática (Morris & Dobson, 2001; Fossum et al., 2007).

Tabela 4 - Classificação TNM (Adaptada de Dobson & Lascelles, 2011)

O Sistema TNM		
Parâmetro	Características	
T – Dimensão do tumor primário	T1	< 3 cm de diâmetro máximo
	T2	3-5 cm de diâmetro máximo
	T3	> 5 cm de diâmetro máximo
	T4	Carcinoma inflamatório
N – Estado dos linfonodos regionais	N0	Sem metástases*
	N1	Metástases no linfonodo ipsilateral
	N2	Metástases no linfonodo contralateral
M – Metástases à distância	M0	Sem metástases à distância
	M1	Com metástases à distância

(T) tumor primário; (N) linfonodos locais e regionais; (M) metástases à distância; (*) com base na análise citológica ou histológica

Tabela 5 – Estadiamento clínico (Adaptada de Dobson & Lascelles, 2011)

Tipo de Estadiamento Clínico da Doença Oncológica			
Grau	Características dos Sistema TNM		
I	T1	N0	M0
	T0-1	N1	M0
II	T2	N0-1	M0
	T3	Nx	M0
III	Tx	N2	M0
	Tx	Nx	M1
IV	T4	Nx	Mx

(Tx) qualquer T; (Nx) qualquer N; (Mx) qualquer M

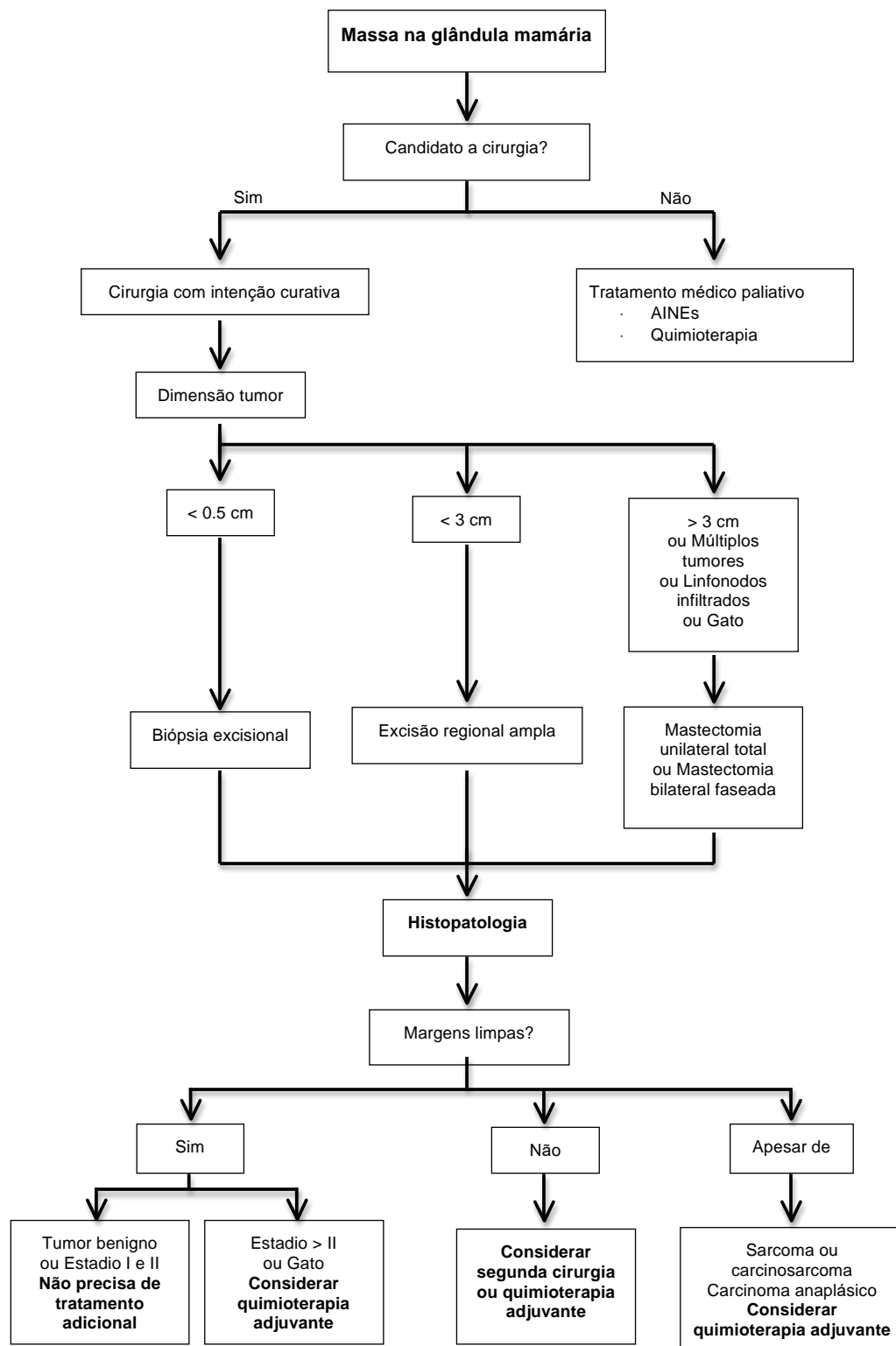
A abordagem cirúrgica para o tumor de mama é o tratamento de eleição (exceto para carcinomas inflamatórios), com base no estadiamento clínico e grau histológico, devendo sempre preservar-se 2 cm de margem de tecido saudável. As diferentes técnicas consideram a nodulectomia, a mamectomia, a mastectomia unilateral regional, a mastectomia unilateral total e a mastectomia bilateral. Este tipo de abordagem permite o diagnóstico histológico da massa excisada e pode ser curativo, melhorar a qualidade de vida ou alterar a progressão da doença (Dobson & Lascelles, 2011). Os doentes com neoplasias malignas devem ser reavaliados a cada 3 ou 4 meses para pesquisa de metástases e/ou reincidência local (que em cães ocorre em 2 anos e varia de 20% a 73%) (Fossum et al., 2007).

Apesar do consenso relativamente aos benefícios da OVH precoce na prevenção do desenvolvimento de neoplasias mamárias, a realização desta na altura da excisão da neoplasia não influencia o desenvolvimento de uma nova neoplasia benigna, a progressão de neoplasia maligna, o tempo de metastização, nem o tempo de sobrevivência global, em animais já com neoplasia mamária (Morris & Dobson, 2001; Santos & Matos, 2015). No entanto, sempre que os 2 procedimentos sejam efetuados num mesmo tempo cirúrgico, deve optar-se pela realização da OVH antes da mastectomia, de modo a evitar que células neoplásicas entrem na cavidade abdominal (Fossum et al., 2007).

A terapia adjuvante demonstra poucos benefícios clínicos em comparação com a cirurgia isoladamente, no entanto terapias sistémicas podem ser benéficas em cães com neoplasias de alto risco (grandes dimensões, metástases nos linfonodos ou à distância, características histológicas de agressividade) nos quais a cirurgia não pode ser considerada opção, ou em certos tumores em que a cirurgia se demonstra insuficiente para a sobrevivência a longo-prazo. Podem assim optar-se por protocolos de quimioterapia com ciclofosfamida, gencitabina, taxanos e doxorubicina (este último com algum efeito anti-tumoral em células de neoplasia mamária *in vitro*, contudo esse efeito em clínica é variável e precisa de maior avaliação). Foram reportadas respostas favoráveis à utilização de um protocolo com 5-fluorouracilo e ciclofosfamida (com ou sem doxorubicina) pós-cirurgicamente, em neoplasias malignas (Dobson & Lascelles, 2011). Num outro estudo recente, realizado em 29 cães com neoplasia mamária maligna e disseminação nos linfonodos regionais, foram descritas vantagens significativas na sobrevivência de animais tratados com carboplatina associada ou não com piroxicam ou firocoxib, em comparação com a abordagem cirúrgica isoladamente (Santos & Matos, 2015). Deste modo, e uma vez que as COXs são o principal alvo dos anti-inflamatórios não esteroides (AINEs), o uso de inibidores das COX-2 pode ser

utilizado como terapêutica adjuvante (Queiroga et al., 2010; Teske, 2010). Na maioria dos carcinomas invasivos, para além de não serem particularmente sensíveis à quimioterapia, a doença é já demasiado extensa no momento do diagnóstico para que a esta exerça efeito. A radioterapia demonstrou maior risco de efeitos secundários, principalmente ao nível do trato gastrointestinal, devido à localização anatómica das glândulas mamárias (Morris & Dobson, 2001; Dobson & Lascelles, 2011) . A utilização destes protocolos de radiação e quimioterapia, promovem a morte celular através de danos induzidos no DNA, desencadeando consequentemente os mecanismos normais de apoptose. Contudo, células neoplásicas com defeitos nos mecanismos de apoptose, tendem a ser resistentes a estas estratégias. Além disso, quando sujeitas à inibição de vias específicas, as células malignas parecem ser capazes de estabelecer um novo equilíbrio entre moléculas apoptóticas e anti-apoptóticas. O tratamento hormonal com substâncias anti-estrogénicas, como o tamoxifeno, está contraindicado, pois os efeitos anti-tumorais em neoplasias mamárias malignas agressivas são mínimos quando comparados com a quantidade de efeitos secundários que produz (corrimento vaginal, edema vulvar, piómetra, entre outros). Esta falha terapêutica pode ser explicada pela baixa expressão de recetores de estrogénio (ER) por estes tumores invasivos (Dobson & Lascelles, 2011; Santos & Matos, 2015). Num estudo realizado em 18 cães com neoplasia mamária maligna não metastática, demonstrou-se que a utilização de goserelina reduzia o tamanho da neoplasia e aumentava o tempo livre de doença. Há também evidências de que a aglepristona (antagonista da progesterona) diminui significativamente a proliferação de carcinomas mamários positivos a recetores de progesterona (PR), sugerindo que este possa ser um potencial adjuvante no tratamento destes cães. Dois estudos realizados em cães com neoplasias mamárias em estadios III e IV demonstraram que a administração intravenosa de desmopressina, no período peri-operatório, aumentou significativamente o tempo livre de doença e o tempo de sobrevivência global, apesar do exato mecanismo de ação ser ainda desconhecido (Santos & Matos, 2015). Segue em esquema na Figura 10 um tipo de abordagem, proposto por (Dobson & Lascelles, 2011), a neoplasias mamárias em cães e gatos.

Figura 10 – Árvore de decisão clínica na abordagem de caso de neoplasia canina e felina
(Adaptada de Dobson & Lascelles, 2011)



O prognóstico do tumor de mama é influenciado, para além do tipo e grau histológico (baseado no índice mitótico, pleomorfismo nuclear e grau de formação tubular) e características imunohistoquímicas: pelo tamanho e volume da neoplasia, pelo estadio clínico (estadio alto relacionado com pior prognóstico), pela atividade de recetores hormonais, pelo grau de diferenciação nuclear e ploidia de DNA (neoplasias mamárias aneuploides e sem diferenciação têm pior prognóstico),

pelo grau de invasão tissular e vascular, pela evidência de reatividade celular linfoide, pelo envolvimento dos linfonodos e metastização à distância, pela presença de ulceração, pela fixação e pela taxa de Fase S (alto índice de células nesta fase associado com menor tempo de sobrevida). Em cães, a presença de múltiplos tumores não altera o prognóstico, no entanto o aumento da dimensão do tumor primário aumenta o risco de metastização e diminui o tempo de sobrevida (MacEwen, 1990; Morris & Dobson, 2001; Fossum et al., 2007; McGavin & Zachary, 2007) .

Neoplasias mamárias com menos de 1 cm de diâmetro apresentam um tempo de sobrevida mais favorável; neoplasias de 2 a 3 cm, apesar do prognóstico ainda favorável, estimam-se 22 meses de sobrevida e 35% de recidiva em 2 anos; enquanto neoplasias com diâmetros superiores a 3 cm têm já prognósticos mais reservados, com cerca de 14 meses de vida após a cirurgia e 80% de recidiva em 2 anos. Neoplasias com diâmetro superior a 5 cm (quer por rápido crescimento, quer por um maior tempo de desenvolvimento) apresentam um prognóstico desfavorável, devido à existência de uma potencial progressão de benigno para maligno (McGavin & Zachary, 2007; Dobson & Lascelles, 2011) .

Diferentes marcadores imunohistoquímicos têm sido utilizados como marcadores de prognóstico, tais como:

- ✓ Atividade dos recetores de hormonas sexuais: a expressão dos ER e PR está relacionada com o grau de malignidade e prognóstico de neoplasia mamária. Embora não totalmente consensual, muitos estudos têm demonstrado que estes recetores tendem a diminuir com o crescente grau de malignidade e pior prognóstico. Contudo os estudos de imunohistoquímica não avaliam a funcionalidade do recetor (capacidade de ligação à hormona), o que sugere que a importância biológica destes possa ser sobrestimada (Dobson & Lascelles, 2011; Matos & Santos, 2015).
- ✓ Marcadores de índice mitótico: quanto maiores os níveis dos marcadores de proliferação – regiões organizadoras do nucléolo argirofílico (AgNOR), antígeno Ki-67 e antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) – pior é o prognóstico (12 meses *versus* 22 meses de sobrevida) e maior é a probabilidade de alto grau histológico (Dobson & Lascelles, 2011; Matos & Santos, 2015).

- ✓ Expressão do recetor do fator de crescimento epidérmico humano-tipo 2 (HER-2) (ou *neu*): o seu aumento é considerado um indicador de mau prognóstico, como grau histológico III; crescimento invasivo; tipo histológico simples; e ausência de recetores de hormonas esteroides (Dobson & Lascelles, 2011).
- ✓ Expressão do recetor do fator de crescimento epitelial (EGFR ou HER-1): este recetor ativa várias vias de sinalização tumoral, promovendo a proliferação de células cancerígenas, metástases e resistência ao tratamento em resposta a vários fatores. No entanto a sua presença tem sido demonstrada tanto em tecido mamário normal como neoplásico. Recentemente foi reportada uma associação positiva entre o EGFR e o tamanho do tumor, o grau histológico e o estadio clínico, sugerindo que este contribui para uma maior agressividade tumoral. O que veio possibilitar a investigação acerca da utilização de inibidores destes recetores (ex. cetuximab) em neoplasias mamárias (Matos & Santos, 2015).
- ✓ BRCA1 e 2: a redução e distribuição aberrante em tumores mamários está significativamente associada com características malignas. Estes “genes de suscetibilidade ao cancro de mama”, pertencem a uma das famílias de genes mais importantes na deteção e reparação de danos no DNA. A inativação dos genes de reparação do DNA, por mutações ou alterações epigenéticas, acelera a progressão maligna das células neoplásicas, aumentando a sua taxa de mutação. Estes genes foram ainda encontrados sobre-expressados em metástases de linfonodos, suportando o seu envolvimento na progressão tumoral (Dobson & Lascelles, 2011).
- ✓ E-caderina: é uma molécula de adesão celular epitelial cálcio-dependente, importante durante o desenvolvimento embrionário e para a manutenção da arquitetura tissular em adultos. A perda ou redução está associada com menor diferenciação tumoral, com maiores tamanhos de tumores, com crescimento invasivo e predisposição de metástases, e com tempo de sobrevivência e período livre de doença menores (Dobson & Lascelles, 2011).
- ✓ p53: mutações neste gene encontram-se associadas com progressão, aumento do potencial maligno e pior prognóstico em neoplasias mamárias. Defeitos nos genes supressores de tumores permitem que, durante a replicação celular, sejam ignorados pontos de verificação normais do ciclo celular, causando a acumulação de erros de DNA, podendo levar a uma divisão e proliferação celulares aceleradas e descontroladas. O gene p53 tem um papel importante no ciclo de regulação celular, sendo um pilar essencial do mecanismo de reparação de DNA, indispensável à manutenção da integridade do mesmo (Dobson & Lascelles, 2011).

Até agora, apenas um pequeno número de genes e proteínas demonstraram ter valor clínico. Segundo Matos & Santos (2015) algumas das moléculas, ou não têm valor (por exemplo, EGFR, PCNA e GH) ou apresentam um valor potencial mas necessitam ainda de padronização dos métodos de avaliação (ex. HER-2, ER e AgNOR). De acordo com estes autores, atualmente as moléculas que podem ser utilizadas com valor de prognóstico clínico são o p53, PR e Ki-67 (Morris & Dobson, 2001). Um estudo recente, realizado em 27 cadelas, demonstrou a existência de valor de prognóstico na expressão da enzima COX-2 em neoplasias mamárias caninas, tendo sido associada a envolvimento dos linfonodos na altura da cirurgia, e ao desenvolvimento de metástases à distância, durante o seguimento dos pacientes. Diversos estudos têm revelado a sua expressão associada a tumores mamários mais agressivos, com tempo livre doença e tempo de sobrevida global mais reduzidos, traduzindo-se num pior prognóstico. No entanto concluíram que, esta avaliação isoladamente, não tem valor de prognóstico (Queiroga et al., 2007; Queiroga et al., 2010).

3. A RELAÇÃO DO CORTISOL COM A DOENÇA ONCOLÓGICA DA MAMA

O estudo da relação dos níveis do cortisol com a doença oncológica da mama, tem sido realizado apenas na Medicina Humana, concluindo até então que o aumento dos níveis de cortisol se poderá relacionar com 2 fatores distintos 1) o *stress* do doente pelo facto de ter consciência do tipo de doença, e 2) o tipo de terapêutica a realizar. É conhecido que no Homem a doença oncológica induz um *stress* físico e emocional promovendo a ativação de um conjunto variado de mecanismos de resposta, tais como a ativação do sistema de inervação simpática e ainda do eixo HHA, com consequente libertação de catecolaminas e glucocorticoides (Benish & Ben-Eliyahu, 2010; Mundy-Bosse, Thornton, Yang, Andersen, & Carson, 2011). A ativação repetida deste eixo leva à sua desregulação com consequente alteração do ritmo circadiano, que em pacientes com cancro de mama (principalmente em estadio de doença metastática) se apresenta alterado (com flutuações erráticas ou planas), revelando-se ainda estar associado a uma mortalidade precoce destes pacientes (Sephton, Sapolsky, Kraemer, & Spiegel, 2000; Kim et al., 2012) . Através de ações imunossupressoras, os glucocorticoides revelaram ter um papel importante no crescimento de tumores. O cortisol, por ligação a recetores no interior das células imunitárias, regula a migração e distribuição destas células nos tecidos, promovendo uma diminuição da vigilância imunitária contra os processos oncológicos existentes e em desenvolvimento, diminuindo assim os níveis de destruição de células oncológicas (Amorim & Siqueira, 2014). O cortisol promove ainda uma imunossupressão através: 1) da interrupção da síntese de proteínas (imunoglobulinas); 2) da alteração plasmática periférica do nível de eosinófilos, de linfócitos e de macrófagos e 3) da diminuição da contagem de células citotóxicas (*natural*

killer - NK), e da síntese do TNF α e do Interferão γ (IFN γ), ambas moléculas que desempenham um papel muito importante no controlo da progressão dos tumores de mama. Como consequência desta diminuição da função imunitária, existe uma maior suscetibilidade do indivíduo face aos processos infecciosos e neoplásicos, principalmente quando esta condição se repete de forma crónica, por multiplicação dos efeitos e desgaste do organismo (Benish & Ben-Eliyahu, 2010; Mundy-Bosse et al., 2011). Alguns estudos em animais revelaram ainda que o cortisol, para além de suprimir o número e atividade das células NK, promove também a angiogénese de tumores e acelera o crescimento de certos tipos de neoplasias (Talbot, 2007). Mundy-Bosse et al. (2011), defendem ainda no seu estudo publicado que a relação entre o nível de *stress* e a evolução do processo tumoral, pode ser explicada pelo facto das células supressoras do sistema imunitário derivadas da linhagem mieloide (MDSC) se encontrarem aumentadas em doentes com neoplasia. Estas células são produzidas ao nível da medula óssea em resposta a fatores sintetizados pelo tumor os quais promovem a sua migração (das células MDSC) para o local de desenvolvimento do processo oncológico. A condição de *stress* promove o aumento de citocinas pró-inflamatórias como a IL-6, o VEGF e MDSC, com um impacto negativo na função imunitária, comprometendo a capacidade de controlar ou mesmo eliminar o tumor, e consequentemente a sobrevivência do paciente. Importante também, é o tipo de procedimento cirúrgico realizado ao doente, já que ele também influencia a geração e sobrevivência de MDSC, sendo que quanto mais agressiva é a cirurgia menor é o número destas células. Por ser responsável por diminuir as defesas do organismo, aumentar o risco de desenvolvimento e progressão de tumores e estar relacionado com piores prognósticos, o cortisol poderá apresentar algum valor preditivo na monitorização de processos que envolvam a proliferação celular (Kim et al., 2012; Amorim & Siqueira, 2014).

C - ESTUDO CLÍNICO

1. OBJETIVOS

O presente estudo foi realizado em doentes da espécie *Canis familiaris* submetidos a mastectomia por doença oncológica da mama, e teve como principais objetivos:

- 1) Caracterizar a variação das concentrações de cortisol num período pré- e pós-cirúrgico;
- 2) Estudar a relação entre as concentrações de cortisol e a sua variação com os parâmetros: idade, peso vivo, localização das massas tumorais, número de mamas envolvidas na doença oncológica, estadiamento clínico da doença, presença de doenças de base, e estado teriogenológico da fêmea;
- 3) Estudar a relação entre a idade e o peso vivo das doentes com os parâmetros: localização das massas tumorais, número de mamas envolvidas na doença oncológica e estadiamento clínico da doença.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo foi realizado numa amostra de 15 canídeos (n=15), do género feminino, com idades compreendidas entre os 7 e os 16 anos, peso vivo entre 5,3 kg e 33,2 kg, apresentadas à consulta no CMVAA com história clínica de 1 ou mais nódulos presentes em 1 ou em ambas as cadeias mamárias, com diagnóstico citológico prévio (por PAAF) de doença oncológica da mama, e submetidas a cirurgia oncológica do tipo mastectomia total unilateral com esvaziamento linfático. Cada doente apenas foi integrada no estudo após consentimento prévio informado dos proprietários e assinatura de um termo desenvolvido para o efeito. Não existiu seleção para o parâmetro. Fêmeas com metastização identificada com o recurso a radiografias pulmonares foram excluídas do estudo por não serem candidatas a intervenção cirúrgica. Nenhuma das doentes tinha sido sujeita previamente a controlo de estro com recurso a contraceptivos e todas as não-ovariohisterectomizadas se encontravam em anestro.

Todas as doentes foram sujeitas a exames complementares de diagnóstico prévios à cirurgia, que consideraram hemograma, provas bioquímicas das funções hepática e renal, exame radiográfico torácico em duas projeções laterolaterais (direita e esquerda), ultrassonografia abdominal (em alguns casos) e traçado de eletrocardiograma.

Foram ainda registadas para cada doente as seguintes informações: número de mamas afetadas; localização do tumor; dimensão aproximada do tumor; presença ou ausência de

ulceração cutânea do tumor; histopatologia do tumor; classificação TNM; estadio clínico; concentração de cortisol em T0 e concentração de cortisol em T1.

Cada doente foi sujeita a 2 colheitas de um volume de 0,5 ml de sangue periférico para doseamento de cortisol: 1) em T0 (15h do dia da cirurgia, utilizando a amostra colhida para a medicina laboratorial pré-cirúrgica) e posteriormente 2) em T1 (15h do 10º dia após a cirurgia). A colheita foi realizada através de punção na veia cefálica, colocada num tubo com EDTA, e com o mínimo de contenção e *stress* possíveis das doentes. Após processada, a amostra foi enviada para laboratório onde foi analisada por RIA.

Todas as doentes receberam o mesmo protocolo medicamentoso pré-cirurgicamente, utilizando para tal amoxicilina + ácido clavulânico (10 mg/kg), carprofeno (4 mg/kg), buprenorfina (0,002 mg/kg). A indução anestésica utilizou propofol (4 mg/kg), e foi mantida após intubação com sonda de Magil com isoflurano. No final da cirurgia procedeu-se à infiltração de lidocaína (1 ml/cm³) ao longo de toda a linha de sutura. Todas as peças anatómicas resultantes da exérese realizada foram devidamente acondicionadas em recipientes com formol a 10% e enviadas para exame anatomopatológico.

No regime pós-cirúrgico as doentes mantiveram como protocolo medicamentoso amoxicilina + ácido clavulânico (10 mg/kg), durante 10 dias e carprofeno (4 mg/kg), durante 8 dias. Foram reavaliadas ao final de 24 horas pós-operatórias e ao 10º dia, onde se procedeu à colheita de sangue periférico (T1).

Os dados recolhidos foram analisados estatisticamente utilizando o programa R. A normalidade foi avaliada com o teste de Shapiro-Wilk e utilizaram-se testes paramétricos quando se tratava de variáveis com distribuição normal e para as variáveis que não demonstravam uma distribuição normal, utilizaram-se testes estatísticos não-paramétricos. Para testar a correlação de diferentes parâmetros quantitativos entre si e com as concentrações de cortisol em T0 e a sua variação (de T0 para T1), utilizou-se o teste de correlação de Spearman. O teste de t-Student para amostras emparelhadas foi utilizado para comparar os valores de cortisol em T0 e em T1, e o de Wilcoxon para 2 amostras e de t-Student para amostras independentes (quando distribuição normal) utilizou-se para avaliar a relação entre os valores de cortisol e o facto de as pacientes terem ou não doença cardíaca e serem ou não ovariectomizadas. Por último, e para perceber se existia algum tipo de relação entre a localização dos tumores (mamas torácicas, abdominais ou ambas) e os restantes parâmetros, recorreu-se ao teste de ANOVA e Kruskal-Wallis. Todos os valores de $p < 0,05$ foram considerados como estatisticamente significativos.

3. RESULTADOS

Os dados obtidos com o estudo foram registrados, possibilitando a construção de uma base de dados, de modo a poder realizar o estudo de estatística descritiva considerando as medidas de dispersão (mínimo, máximo, média, mediana e desvio padrão), e de estatística inferencial.

3.1. Estatística descritiva

A Tabela 6 resume os valores de estatística descritiva para os parâmetros considerados: idade, peso vivo, raça, estado teriogenológico da fêmea no momento da cirurgia, dimensão dos nódulos mamários, número de mamas envolvidas no processo oncológico, localização dos nódulos mamários, tipo de mastectomia realizada, estadiamento clínico das doentes (de acordo com a classificação TNM), concentrações de cortisol, e a existência ou não de alguma doença de base. A faixa etária das doentes variou entre os 7 e os 16 anos de idade, com uma média de 11,2 anos de idade. As doentes da amostra estudada tinham um peso vivo mínimo de 5,3 kg e um máximo de 33,2, com uma média de peso de 12,56 kg e desvio padrão de 7 kg, o que demonstra uma grande variação de pesos em relação à média. A maioria das doentes apresentadas no estudo eram de raça indefinida (60%), sendo que 26,67% eram de raça Caniche, 6,67% de raça Labrador e 6,67% de raça Cocker Spaniel. Quanto ao estado teriogenológico das doentes estudadas, apenas uma delas tinha sido ovariectomizada antes do 1º estro, 6 após os 2 anos de vida e as restantes 8 eram ainda fêmeas inteiras, resultando em que 53,33% eram fêmeas inteiras e 46,67% tinha sido ovariectomizadas previamente a este estudo. Quanto à dimensão dos nódulos mamários, os valores variaram entre os 2 cm e os 10 cm, com um valor médio de 4 cm e desvio padrão de 2,2 cm. O número de mamas envolvidas na doença oncológica variou entre um mínimo de 1 mama e um máximo de 5 mamas, com uma média de 2,3 mamas envolvidas. Das 15 doentes, 46,67% tinham apenas as mamas abdominais afetadas, 6,67% apenas as mamas torácicas e 46,67% tinham ambas (torácicas e abdominais) afetadas pelo processo neoplásico. Em todos os casos foi realizada mastectomia do tipo unilateral total (100%), dos quais 60% foram da cadeia mamária direita e 40% da cadeia mamária esquerda. A partir do estadiamento clínico das doentes (com base no sistema de classificação TNM) 26,67% foram classificadas no estadio I, 60% no estadio II e 13,33% no estadio III. Dos valores de cortisol doseados em T0 obteve-se uma concentração média de 2,99 µg/dL, que diminuiu no doseamento realizado em T1 (2,68 µg/dL). Todas as doentes apresentaram como diagnóstico anatomopatológico Adenocarcinoma tubulopapilífero mamário. Do total das doentes da amostra, 33,3% apresentava outra doença de base, sendo que 20% desses animais eram insuficientes cardíacos (a ser medicadas com

benazepril e furosemida), 6,67% eram atópicos (a ser medicados com ciclosporina) e 6,67% apresentava Síndrome de Disfunção Cognitiva (a ser medicados com piracetam).

Tabela 6 – Análise de estatística descritiva dos dados referentes à caracterização da amostra utilizada no estudo (n=15), considerando os parâmetros idade, peso vivo, raça, teriogenologia, dimensão dos nódulos mamários, número de mamas envolvidas, localização da lesão, tipo de mastectomia realizada, estadio clínico da doente (TNM), valor de cortisol e doença de base

PARÂMETRO		Mínimo	Máximo	Mediana	Média	Desvio padrão	%	Shapiro-Wilk p-valor
Idade (anos)		7,00	16,00	11,00	11,20	2,91	-	0,48
Peso vivo (kg)		5,30	33,20	11,20	12,56	7,02	-	0,01
Raça	Indefinida	-	-	-	-	-	60,00	-
	Caniche	-	-	-	-	-	26,67	-
	Cocker Spaniel	-	-	-	-	-	6,67	-
	Labrador	-	-	-	-	-	6,67	-
Teriogenologia	Inteira	-	-	-	-	-	53,33	-
	Ovariectomizada	-	-	-	-	-	46,67	-
Dimensão dos nódulos mamários (cm)		2,00	10,00	3,00	4,03	2,18	-	0,01
Número de mamas envolvidas		1,00	5,00	2,00	2,33	1,18	-	0,07
Localização da lesão	Torácicas	-	-	-	-	-	6,67	-
	Abdominais	-	-	-	-	-	46,67	-
	Ambas	-	-	-	-	-	46,67	-
Tipo de mastectomia realizada	Total direita	-	-	-	-	-	60,00	-
	Total esquerda	-	-	-	-	-	40,00	-
Estadio Clínico da doente (TNM)	I	-	-	-	-	-	26,67	0,00
	II	-	-	-	-	-	60,00	
	III	-	-	-	-	-	13,33	
Valor de Cortisol (µg/dL)	T0	0,87	4,93	3,30	2,99	1,33	-	0,04
	T1	0,36	3,90	3,10	2,68	1,12	-	0,01
	ΔT	-0,22	1,15	0,27	0,30	0,40	-	0,24
Doença de base	Insuficiência Cardíaca	-	-	-	-	-	20,00	-
	Atopia	-	-	-	-	-	6,67	-
	Síndrome de Disfunção Cognitiva	-	-	-	-	-	6,67	-
	Sem doença de base	-	-	-	-	-	66,67	-

(T0) dia da cirurgia; (T1) 10º dia pós-cirurgia; (ΔT) variação de cortisol entre T0 e T1

3.2. Estatística inferencial

O uso da estatística inferencial procurou avaliar a presença ou não de relações entre as diferentes variáveis estudadas no trabalho.

O parâmetro idade das doentes foi avaliado de modo a testar o tipo de correlação existente com 1) a localização do tumor (mamas torácicas, abdominais ou em ambas), 2) o número de mamas envolvidas e 3) o estadiamento clínico da doença. De acordo com a análise estatística realizada, não foi encontrada nenhuma relação estatisticamente significativa ($p > 0,05$) entre as variáveis consideradas, nomeadamente localização ($p = 0,52$), número de mamas envolvidas ($p = 0,76$) e estadio clínico ($p = 0,49$) (Tabela 7).

O peso vivo das doentes foi testado quanto à correlação com 1) a localização do tumor (mamas torácicas, abdominais ou em ambas), 2) o número de mamas envolvidas e 3) o estadio clínico da doença, de modo a avaliar uma possível correlação com estes parâmetros. De acordo com a análise estatística realizada, não foi encontrada nenhuma relação estatisticamente significativa ($p > 0,05$) entre as variáveis consideradas, nomeadamente localização ($p = 0,90$), número de mamas envolvidas ($p = 0,79$) e estadio clínico ($p = 0,35$) (Tabela 7).

O estadiamento clínico com base no sistema de classificação TNM foi avaliado para a sua relação com 1) a localização do tumor (mamas torácicas, abdominais ou em ambas), 2) a condição das doentes serem ou não ovariectomizadas e 3) de terem ou não, como doença de base Insuficiência Cardíaca (IC). De acordo com a análise estatística realizada, não foi encontrada nenhuma relação estatisticamente significativa entre as variáveis consideradas ($p > 0,05$), nomeadamente localização ($p = 0,25$), OVH ($p = 0,96$) e IC ($p = 0,80$) (Tabela 7).

Tabela 7 – Análise estatística inferencial em relação à idade, peso e estadio clínico dos doentes

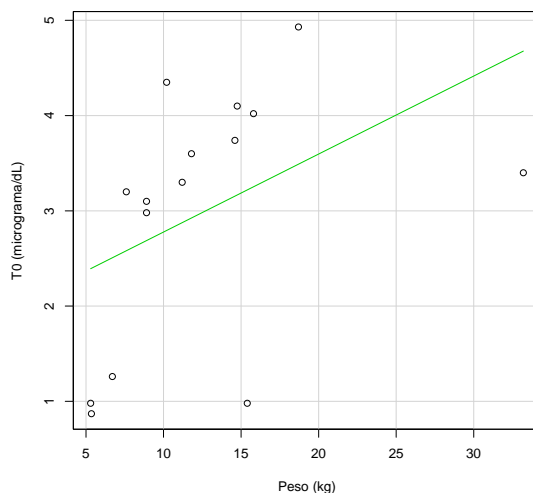
PARÂMETRO		Testes estatísticos			
		Spearman	Kruskal-Wallis	ANOVA	t-Student
Idade	Localização	–	–	Pr = 0,52	–
	Nº mamas	Valor de p = 0,76	–	–	–
	Estadio clínico	–	–	Pr = 0,49	–
Peso vivo	Localização	–	–	Pr = 0,90	–
	Nº mamas	Valor de p = 0,79	–	–	–
	Estadio clínico	–	–	Pr = 0,35	–
Estadio clínico	IC	–	–	–	Valor de p = 0,80
	OVH	–	–	–	Valor de p = 0,96
	Localização	–	Valor de p = 0,25	–	–

(IC) Insuficiência Cardíaca; (OVH) Ovariectomia

No que respeita à concentração de cortisol, optou-se por considerar neste estudo de estatística inferencial apenas os valores de cortisol em T0 e a variação entre T0 e T1. Não se consideraram os valores de T1 uma vez que, supostamente, doentes que apresentassem valores mais elevados de cortisol em T0, também os iriam apresentar em T1.

A concentração de cortisol em T0 (dia da cirurgia) foi avaliada de forma a apurar se havia relação entre esta e 1) a idade dos doentes, 2) o peso vivo, 3) a condição das doentes serem ou não ovariectomizadas e 4) de terem ou não, como doença de base, Insuficiência Cardíaca, 5) a localização do tumor (mamas torácicas, abdominais ou em ambas), 6) o número de mamas envolvidas, 7) o estadio clínico da doença e 8) a concentração de cortisol em T1 (10º dia pós-cirurgia). De acordo com os resultados obtidos, os valores da correlação relativamente aos parâmetros idade, número de mamas envolvidas, estadio clínico da doença, localização do tumor, condição clínica de base das doentes com ou sem IC, e o facto de serem ou não ovariectomizadas não foram estatisticamente significativos ($p > 0,05$) (Tabela 8). No que diz respeito ao peso vivo dos animais, verificou-se que há correlação positiva com a concentração de cortisol em T0 ($\rho = 0,65$), e que esse valor é estatisticamente significativo ($p = 0,01$). Esta correlação encontra-se representada no gráfico 1.

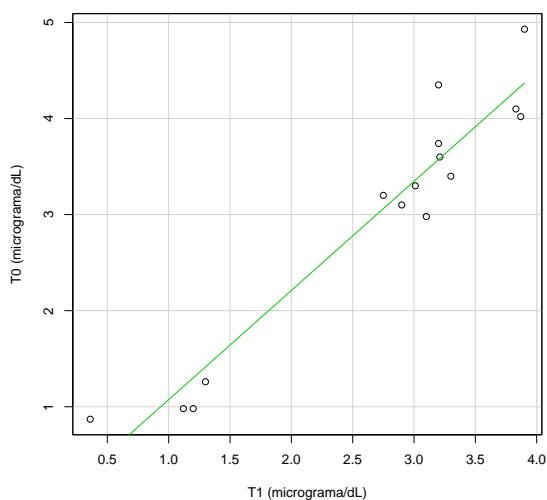
Gráfico 1 – Correlação entre a concentração de cortisol em T0 e o peso dos doentes



(T0) dia da cirurgia

Para testar a relação das concentrações de cortisol em T0 e T1, recorreu-se a 2 testes diferentes. O teste estatístico de Spearman demonstrou que existe uma correlação positiva entre T0 e T1 ($\rho = 0,91$), sendo que quando um valor aumenta o outro aumenta de igual forma, e este valor de correlação é estatisticamente significativo ($p < 0,05$). Esta correlação encontra-se representada no gráfico 2.

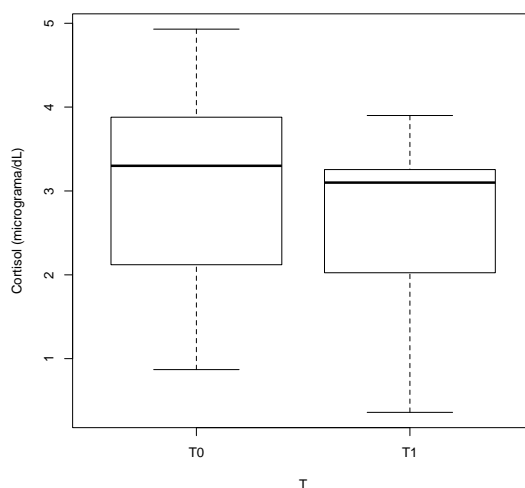
Gráfico 2 – Correlação entre as concentrações de cortisol em T0 e em T1



(T0) dia da cirurgia; (T1) 10º dia pós-cirurgia

O teste de t-Student emparelhado foi utilizado para perceber se havia diferença entre os valores de cortisol entre T0 e T1 tendo-se verificado, a partir dos valores das médias das concentrações de cortisol em T0 e em T1 (2,99 e 2,68 respectivamente), que estas concentrações diminuem de T0 para T1, havendo uma diferença média de 0,3 e sendo esta diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Esta diferença é representada no gráfico 3.

Gráfico 3 – Diferença nas concentrações de cortisol em T0 e em T1



(T) tempo; (T0) dia da cirurgia; (T1) 10º dia pós-cirurgia

Tabela 8 – Análise estatística inferencial em relação às concentrações de cortisol

		Parâmetro	Testes estatísticos			
	Tempo		Spearman	Wilcoxon duas-amostras	t-Student	ANOVA
			Valor de p	Valor de p	Valor de p	Valor de p
CONCENTRAÇÃO DE CORTISOL	T0	Idade	0,492	–	–	–
		Peso vivo	0,009 rho = 0,648	–	–	–
		IC	–	–	0,582	–
		OVH	–	–	0,286	–
		Localização	–	–	–	0,715
		Nº mamas	0,9138	–	–	–
		Estadio clínico	–	–	–	0,081
		T1	2,743e ⁻⁰⁶ rho = 0,909	–	0,010 Diferença média = 0,300	–
	ΔT	Idade	0,799	–	–	–
		Peso vivo	0,666	–	–	–
		IC	–	0,365	–	–
		OVH	–	0,463	–	–
		Localização	–	–	–	0,923
		Nº mamas	0,256	–	–	–
		Estadio clínico	–	–	–	0,386

(T0) dia da cirurgia; (T1) 10º dia pós-cirurgia; (ΔT) variação de concentrações de cortisol entre (T0 e T1); (IC) Insuficiência Cardíaca; (OVH) ovariectomia

A variação da concentração de cortisol ΔT foi avaliada em relação 1) à idade dos doentes, 2) ao peso dos doentes, 3) à condição das doentes serem ou não ovariectomizadas e 4) de terem ou não, como doença de base, Insuficiência Cardíaca, 5) à localização do tumor (se nas mamas torácicas, abdominais ou em ambas), 6) ao número de mamas envolvidas e 7) ao estadio clínico da doença. De acordo com a análise estatística realizada, não foi encontrada nenhuma relação estatisticamente significativa ($p > 0,05$) entre as variáveis consideradas, nomeadamente idade ($p = 0,80$), peso vivo ($p = 0,67$), OVH ($p = 0,46$), IC ($p = 0,37$), localização ($p = 0,94$), número de mamas envolvidas ($p = 0,26$) e estadio clínico ($p = 0,39$) (Tabela 8).

4. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos, verificou-se que a média de idades das doentes da amostra (11.2 anos) está de acordo com a média de idades descrita na bibliografia como sendo a faixa etária mais predisposta ao aparecimento de doença oncológica mamária, e que é de 10 anos (Morris & Dobson, 2001). Este parâmetro não demonstrou qualquer relação estatisticamente significativa com os parâmetros: localização das massas tumorais, o número de mamas envolvidas, ou mesmo o estadiamento clínico da doença, permitindo concluir que o facto de serem indivíduos mais ou menos idosos não interfere com a progressão da doença oncológica da mama.

Considerando que a amostra era constituída na sua maioria por indivíduos sem raça definida, a avaliação do parâmetro peso vivo tornou-se mais difícil já que é impossível estipular um peso vivo considerado padrão para cada uma das doentes. Todas as doentes tinham uma nutrição de base comercial e nenhuma delas apresentava uma condição corporal classificada como Obesa de acordo com a escala de LaFlamme (2007) (Dobson & Lascelles, 2011). Não foi possível estabelecer uma relação entre o peso vivo das doentes e os parâmetros: localização do tumor, número de mamas envolvidas, e estadiamento clínico das doentes.

Segundo Dobson & Lascelles (2011) a raça Cocker Spaniel é uma das referidas como sendo das mais predispostas para ao desenvolvimento de tumor mamário. Pelo facto de a amostra apresentar apenas uma doente desta raça, não foi possível estabelecer alguma relação entre os dados obtidos que corroborasse esta afirmação.

Tal como descrito na revisão bibliográfica, também no presente estudo as doentes não ovariectomizadas surgem em maior percentagem relativamente às doentes previamente sujeitas a ovariectomia, e com diagnóstico de tumor de mama. Contudo, a percentagem de animais da amostra ovariectomizados foi ainda alta, o que pode ser explicado pelo facto de apenas uma das doentes ter realizado a ovariectomia antes do 1º estro (assumindo assim uma probabilidade de apenas 0.05% de desenvolver a doença) e nas restantes 6 doentes a ovariectomia ter sido realizada após o 2º estro o que de acordo com Morris & Dobson (2001), apresentam um risco de 26% de desenvolverem doença oncológica da mama.

Em relação à localização das massas tumorais, os resultados encontrados neste estudo vão de encontro aos descritos por Morris & Dobson (2001), verificando-se que foram as mamas abdominais as que apresentaram maior número de tumores mamários.

A maioria das doentes estudadas apresentavam doença oncológica caracterizada como estando em estadio clínico II, provavelmente devido ao facto das fêmeas com metastização terem sido desde logo excluídas do estudo, e por ainda não existir clinicamente uma situação de infiltração dos linfonodos regionais. A partir dos resultados estatísticos foi possível concluir que, para o estadiamento clínico, é indiferente a localização das lesões mamárias. Também para o parâmetro associado ao facto das doentes serem ou não ovariectomizadas poderia indicar um estadio de doença mais ou menos avançado, o que não se verificou. Provavelmente este parâmetro teria alguma influência ao nível do tempo de sobrevivência da doente após a cirurgia, tal como está referenciado por Dobson & Lascelles (2011). Tal condição não foi possível apurar já que todas as doentes incluídas no estudo, permanecem vivas. De acordo com os resultados obtidos, foi possível verificar que a existência de doença cardíaca concomitante não se revelou importante na progressão da doença oncológica.

Relativamente à existência concomitante de uma outra doença de base, a maioria dos animais nesta condição apresentava Insuficiência Cardíaca, o que pode ser explicado pela faixa etária da amostra que era maioritariamente constituída por animais idosos (média de 11.2 anos), sendo esta a média de idades em que os problemas cardíacos são mais frequentes.

Aquando da avaliação da relação existente entre a concentração de cortisol em T0 e a idade das doentes no momento do estudo, foi possível verificar que estes 2 parâmetros não se encontram correlacionados, podendo assim concluir-se que os níveis de cortisol não variam em função da idade dos animais. Observou-se ainda que os níveis de cortisol se encontram mais elevados em animais com maior peso vivo, o que pode ser explicado pelo efeito direto desta hormona no tecido adiposo, aumentando a lipólise e a redistribuição de gordura para o fígado e para o abdómen (Graves, 2010; Greco, 2013). Por outro lado, um estudo recente realizado a partir do doseamento de cortisol salivar permitiu verificar que os valores de cortisol se encontram mais baixos em cães de porte grande e gigante (Sandri et al., 2015), o que não está de acordo com os resultados obtidos no nosso estudo. Quanto à questão associada ao facto de as doentes serem ou não ovariectomizadas, verificou-se que este não influencia as concentrações de cortisol plasmático, diferindo assim dos resultados publicados por Sandri et al. (2015) com uma amostra de 92 animais, que defende que os níveis de cortisol se encontram mais baixos em animais esterilizados. A existência de insuficiência cardíaca como doença de base nas doentes mastectomizadas, não demonstrou assumir qualquer relação estatisticamente significativa com as concentrações de cortisol em T0. De igual modo, foi possível concluir para o facto de as doentes apresentarem os tumores em diferentes localizações nas cadeias mamárias, ou de terem

um diferente número de mamas envolvidas no processo oncológico diagnosticado, que estes parâmetros não são promotores de maior ou menor grau de *stress* nos animais. Esta conclusão poderá estar dependente pelo facto de não se terem utilizado doentes com tumores ulcerados, os quais sim, poderão induzir um aumento dos níveis de cortisol. O estadiamento clínico das doentes também não demonstrou exercer qualquer influência ao nível das concentrações de cortisol em T0, o que pode ser explicado pelo facto de as doentes seleccionadas não terem doença metastática, podendo indicar que a doença estaria ainda numa fase inicial.

Foi possível verificar que ao longo do tempo e em todas as doentes, as concentrações de cortisol diminuíram de T0 para T1 o que pode ser explicado pela realização da exérese das massas tumorais que reduziu o nível de *stress* físico a que o individuo está exposto pela presença do tumor. Este achado está de acordo com o verificado em Medicina Humana, cuja presença das massas tumorais promove a ativação do eixo HHA com consequente libertação de glucocorticoides (Benish & Ben-Eliyahu, 2010) e por quebra da necessidade da angiogénese e crescimento tumorais promovidas por esta hormona. Observou-se ainda que animais com valores de cortisol mais elevados em T0, tinham-nos também mais elevados em T1, o que pode ser explicado pela variação fisiológica de indivíduo para indivíduo.

No que respeita às variações dos níveis de cortisol entre os tempos considerados (T0 e T1), foi possível constatar que a idade das doentes, a localização do tumor nas cadeias mamárias, o número de mamas envolvidas, o estadiamento clínico da doença, o facto de as doentes serem ou não ovariectomizadas e de terem ou não Insuficiência Cardíaca como doença de base não demonstraram qualquer influência no modo de como o indivíduo responde à variação dos níveis de cortisol de T0 para T1. A variação de cortisol ao longo do tempo não sofreu alteração consoante o peso vivo dos animais.

5. PERSPETIVAS FUTURAS

Devido ao pequeno período de tempo para realizar o trabalho, a amostra utilizada foi limitada quanto ao seu tamanho, o que poderá ter sub- ou sobrevalorizado alguns dos resultados obtidos. O trabalho está agora a ser continuado perspetivando-se o aumento do número da amostra e procurando estudar a relação entre os níveis de cortisol com outros parâmetros, como os diferentes tipos histopatológicos de tumores mamários, de modo a determinar qual o valor de prognóstico que esta hormona poderá apresentar na doença oncológica da mama.

D – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

- Abercrombie, H. C., Giese-Davis, J., Sephton, S., Epel, E. S., Turner-Cobb, J. M., & Spiegel, D. (2004). Flattened cortisol rhythms in metastatic breast cancer patients. *Psychoneuroendocrinology*, 29(8), 1082-1092.
- Accorsi, P. A., Carloni, E., Valsecchi, P., Viggiani, R., Gamberoni, M., Tamanini, C., & Seren, E. (2008). Cortisol determination in hair and faeces from domestic cats and dogs. *General and Comparative Endocrinology*, 155(2), 398-402. doi: 10.1016/j.ygcen.2007.07.002
- Al-Akraa, A. M., El-Kasapy, A.-E.-H. H., & Mostafa, S. A. (2015). Surgical Management and Histopathological Classification of the Canine Mammary Gland Cancers. *International Journal of Advanced Research*, 3(10), 319-330.
- Amorim, M. A. P., & Siqueira, K. Z. (2014). Relação entre vivência de fatores estressantes e surgimento de câncer de mama. *Psicologia Argumento*, 32(79), 143-153.
- Arampatzis, S., Kadereit, B., Schuster, D., Balazs, Z., Schweizer, R. A., Frey, F. J., Langer, T., Odermatt, A. (2005). Comparative enzymology of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 from six species. *Journal of Molecular Endocrinology*, 35(1), 89-101. doi: 10.1677/jme.1.01736.
- Baines, S. (2013). *Cancer biology*. In *Proceedings of the European College of Veterinary Surgeons Annual Scientific Meeting: Roma, Itália, 4-6 July 2013*, ECVS proceedings 2013, pp.43-52. Acedido em Fev. 2016 em : <http://www.ivis.org/proceedings/ecvs/2013/11.pdf?LA=1>.
- Benish, M., & Ben-Eliyahu, S. (2010). Surgery as a double-edged sword: A clinically feasible approach to overcome the metastasis-promoting effects of surgery by blunting stress and prostaglandin responses. *Cancers*, 2(4), 1929-1951.
- Bennett, A., & Hayssen, V. (2010). Measuring cortisol in hair and saliva from dogs: coat color and pigment differences. *Domestic Animal Endocrinology*, 39(3), 171-180. doi: 10.1016/j.domaniend.2010.04.003
- Braund, K.G. (2003). *Neurological Syndromes*. In: Vite C.H. (Ed.), *Braund's Clinical Neurology in Small Animals: Localization, Diagnosis and Treatment*. Ithaca: International Veterinary Information Service (www.ivis.org), Document No. A3202.0203. Acedido em Fev. 2016 em: <http://www.ivis.org/advances/Vite/braund1/chapter.asp?LA=1>.
- Breen, K. M., Stackpole, C. A., Clarke, I. J., Pytiak, A. V., Tilbrook, A. J., Wagenmaker, E. R., Young, E. A., Karsch, F. J. (2004). Does the Type II Glucocorticoid Receptor Mediate Cortisol-Induced Suppression in Pituitary Responsiveness to Gonadotropin-Releasing Hormone?. *Endocrinology*, 145(6), 2739-2746. doi: doi:10.1210/en.2004-0123
- Budras, K.-D., McCarthy, P. H., Fricke, W., & Richter, R. (2007). Endocrine system. In *Anatomy of the Dog*. (5th ed.). (pp.152-153). Germany: Schlutersche.
- Cash, E., Sephton, S., Chagpar, A., Spiegel, D., Rebholz, W., Zimmaro, L., Tillie, J. M., Dhabhar, F. (2015). Circadian disruption and biomarkers of tumor progression in breast cancer patients awaiting surgery. *Brain, behavior, and immunity*, 48, 102-114.
- Castillo, V. A., Cabrera Blatter, M. F., Gomez, N. V., Sinatra, V., Gallelli, M. F., & Ghersevich, M. C. (2009). Diurnal ACTH and plasma cortisol variations in healthy dogs and in those with pituitary-dependent Cushing's syndrome before and after treatment with

retinoic acid. *Research in Veterinary Science*, 86(2), 223-229. doi: 10.1016/j.rvsc.2008.06.006

- Cochran, P. E. (2011). The endocrine system. In *Veterinary anatomy & physiology : a clinical laboratory manual*. (2nd ed.). (p.266-277). Clifton Park, NY: Delmar, Cengage Learning.
- Dallman, M. F., & Bhatnagar, S. (2011). Chronic Stress and Energy Balance: Role of the Hypothalamo-Pituitary-Adrenal Axis. *Comprehensive Physiology*, 179-210.
- Dobson, J. M., & Lascelles, B. D. X. (2011). Clinical staging and TNM classification. In *BSAVA manual of canine and feline oncology*. (3rd ed.). (pp.20-30). Quedgeley, Gloucester: British Small Animal Veterinary Association.
- Dobson, J. M., & Lascelles, B. D. X. (2011). Introduction: cancer in cats and dogs. In *BSAVA manual of canine and feline oncology*. (3rd ed.). (pp.1-5). Quedgeley, Gloucester: British Small Animal Veterinary Association.
- Dyce, K. M., Sack, W. O., & Wensing, C. J. G. (2010). *Textbook of veterinary anatomy* (4th ed.). St. Louis, Missouri.: Saunders/Elsevier.
- Euler, H. von. (2011). Tumours of the mammary glands. In Dobson, J. M., & Lascelles, B. D. X. In *BSAVA manual of canine and feline oncology*. (3rd ed.). (pp.237-247). Quedgeley, Gloucester: British Small Animal Veterinary Association.
- Evans, H. E., & Miller, M. E. (2013). The urogenital system. In *Miller's anatomy of the dog* (4th ed.). (pp.398-400). St. Louis, Missouri: Elsevier.
- Fossum, T. W., Hedlund, C. S., Johnson, A. L., Schulz, K. S., Seim, H. B., Willard, M. D., Bahr, A., Carrol, G. L. (2007). *Small animal surgery* (3rd ed.). Boston, MA: Elsevier.
- Giannetto, C., Fazio, F., Assenza, A., Alberghina, D., Panzera, M., & Piccione, G. (2014). Parallelism of circadian rhythmicity of salivary and serum cortisol concentration in normal dogs. *Journal of Applied Biomedicine*, 12(4), 229-233.
- Goldschmidt, M., Pena, L., Rasotto, R., & Zappulli, V. (2011). Classification and grading of canine mammary tumors. *Veterinary Pathology*, 48(1), 117-131. doi: 10.1177/0300985810393258
- Graves, T. K. (2010). The endocrinology of obesity. In *International Congress of the Italian Association of Companion Animal Veterinarians*, Rimini, Italy, 28-30 May 2010, p.131-132. Acedido em Fev. 2016 em: <http://www.ivis.org/proceedings/scivac/2010/Graves4.pdf?LA=1>.
- Grego, D. S., Stabenfeldt, G. H. (2013). Endocrinology. In Cunningham, J. G., & Klein, B. G., *Cunningham's textbook of veterinary physiology*. (5th ed.). (pp.409-464). St. Louis, Missouri: Elsevier/Saunders.
- Griffin, J. E., & Ojeda, S. R. (2000). *Textbook of endocrine physiology* (4th ed.). New York, N.Y.: Oxford University Press.
- Hall, J. E. (2016). Introduction to Endocrinology. In *Guyton and Hall textbook of medical physiology* (13th edition. ed.). (pp.925-1081). Philadelphia, PA: Elsevier.
- Herrtage, M. E. (2004). Canine hyperadrenocorticism. In Mooney, C. T., & Peterson, M. E. *BSAVA Manual of Canine and Feline Endocrinology* (3rd ed.). Shurdington, Cheltenham, U.K.: British Small Animal Veterinary Association.

- Ho, R. T., Fong, T. C., Chan, C. K., & Chan, C. L. (2013). The associations between diurnal cortisol patterns, self-perceived social support, and sleep behavior in Chinese breast cancer patients. *Psychoneuroendocrinology*, 38(10), 2337-2342.
- Hsiao, F.-H., Kuo, W.-H., Jow, G.-M., Chang, K.-J., Yang, P.-S., Lam, H.-B., Lee, J.-J., Huang, C.-S., Liu, Y.-F., Lai, Y.-M. (2015). Habitual sleep–wake behaviors and lifestyle as predictors of diurnal cortisol patterns in young breast cancer survivors: A longitudinal study. *Psychoneuroendocrinology*, 53, 60-68.
- Hullinger, R. L. (2013). The Endocrine System. In Evans, H. E., & Miller, M. E. *Miller's anatomy of the dog* (4th ed.). (pp.406-424). St. Louis, Missouri: Elsevier.
- Kemppainen, R. J., & Behrend, E. (1997). Adrenal physiology. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 27(2), p173-186.
- Kim, K. S., Kim, Y. C., Oh, I. J., Kim, S. S., Choi, J. Y., & Ahn, R. S. (2012). Association of worse prognosis with an aberrant diurnal cortisol rhythm in patients with advanced lung cancer. *Chronobiology international*, 29(8), 1109-1120.
- Kobelt, A. J., Hemsworth, P. H., Barnett, J. L., & Butler, K. L. (2003). Sources of sampling variation in saliva cortisol in dogs. *Research in Veterinary Science*, 75(2), 157-161.
- Kyle, A. E. (2015). Adrenal Glands. In M. J. Bojrab & E. Monnet (Eds.), *Mechanisms of Disease in Small Animal Surgery* (3rd ed.). USA: Teton NewMedia.
- MacEwen, E. G. (1990). Spontaneous tumors in dogs and cats: models for the study of cancer biology and treatment. *Cancer Metastasis Reviews*, 9(2), 125-136.
- Martí, J. A. (2009). Clinical aspects of mammary disease in the bitch and queen. In *Proceeding of the Southern European Veterinary Conference & Congreso Nacional AVEPA*, Barcelona, Spain, 2-4 Oct. 2009. Acedido em Jan. 2016 em: <http://www.ivis.org/proceedings/sevc/2009/eng/arus1.pdf>.
- Martín de las Mulas, J., & Reymundo, C. (2000). Animal models of human breast carcinoma: canine and feline neoplasms. *Revista de Oncología*, 2(6), 274-281.
- Matos, A. J., & Santos, A. A. (2015). Advances in the understanding of the clinically relevant genetic pathways and molecular aspects of canine mammary tumours: part 1. Proliferation, apoptosis and DNA repair. *The Veterinary Journal*, 205(2), 136-143. doi: 10.1016/j.tvjl.2015.02.004
- McGavin, M. D., & Zachary, J. F. (2007). *Pathologic basis of veterinary disease* (4th ed.). St.Louis: Elsevier Mosby.
- McGeady, T. A., J., Q. P., S., F. E., & Ryan, M. T. (2006). *Veterinary embryology*. Oxford ; Ames, Iowa: Blackwell Pub.
- Morris, J., & Dobson, J. M. (2001). Mammary Gland. In *Small animal oncology*. (pp.184-181). London, UK ; Malden, MA: Blackwell Science.
- Morris, J., & Dobson, J. M. (2001). Pathogenesis and Tumor Biology. In *Small animal oncology*. (pp.4-30). London, UK ; Malden, MA: Blackwell Science.
- Mundy-Bosse, B. L., Thornton, L. M., Yang, H.-C., Andersen, B. L., & Carson, W. E. (2011). Psychological stress is associated with altered levels of myeloid-derived suppressor cells in breast cancer patients. *Cellular immunology*, 270(1), 80-87.

- Ng, Z. Y., Pierce, B. J., Otto, C. M., Buechner-Maxwell, V. A., Siracusa, C., & Werre, S. R. (2014). The effect of dog–human interaction on cortisol and behavior in registered animal-assisted activity dogs. *Applied Animal Behaviour Science*, 159, 69-81.
- Ortsäter, H., Sjöholm, Å., & Rafacho, A. (2012). Regulation of Glucocorticoid Receptor Signaling and the Diabetogenic Effects of Glucocorticoid Excess. In *State of the Art of Therapeutic Endocrinology*, Dr. Sameh Magdeldin (Ed.), InTech, doi: 10.5772/51759. Acedido em Fev. 2016 em: <http://www.intechopen.com/books/state-of-the-art-of-therapeutic-endocrinology/regulation-of-glucocorticoid-receptor-signaling-and-the-diabetogenic-effects-of-glucocorticoid-exces>.
- Papich, M. G. (2015). Glucocorticoids. In Gaynor, J. S., Muir III, W. W. *Handbook of veterinary pain management* (3th ed.). (pp.266-279). St. Louis, Missouri: Elsevier.
- Queiroga, F. L., Alves, A., Pires, I., & Lopes, C. (2007). Expression of Cox-1 and Cox-2 in canine mammary tumours. *Journal of Comparative Pathology*, 136(2-3), 177-185. doi: 10.1016/j.jcpa.2007.01.010
- Queiroga, F. L., Pires, I., Lobo, L., & Lopes, C. S. (2010). The role of Cox-2 expression in the prognosis of dogs with malignant mammary tumours. *Research in Veterinary Science*, 88(3), 441-445. doi: 10.1016/j.rvsc.2009.10.009
- Ramsey, I., & Herrtage, M. (2005). Laboratory diagnosis of adrenal diseases. In E. Villiers & L. Blackwood (Eds.), *BSAVA Manual of Canine and Feline Clinical Pathology* (2nd ed., pp. 278-292). England: British Small Animal Veterinary Association.
- Reece, W. O., Erickson, H. H., Goff, J. P., & Uemura, E. E. (2015). *Dukes' physiology of domestic animals* (13th edition / ed.). Ames, Iowa: John Wiley & Sons Inc.
- Rijnberk, A., & Kooistra, H. S., Galac, S., Reusch, C. E. (2010). Adrenals. In Rijnberk, A., & Kooistra. *Clinical endocrinology of dogs and cats : an illustrated text* (2nd. rev. and extended ed.). (pp.93-154). Hannover: Schlütersche.
- Sadler, T. W., & Langman, J. (2004). Central Nervous System. In *Langman's medical embryology*. (9th edition). (pp.433-482). Philadelphia, USA: Guanabara koogan.
- Sadler, T. W., & Langman, J. (2004). Urogenital System. In *Langman's medical embryology*. (9th edition). (pp.321-362). Philadelphia, USA: Guanabara koogan.
- Sánchez-Céspedes, R., Millán, Y., Guil-Luna, S., Reymundo, C., de los Monteros, A. E., & de las Mulas, C. J. M. (2015). Myoepithelial cells in canine mammary tumours. *The Veterinary Journal*, 207, 45-52. doi:10.1016/j.tvjl.2015.10.035.
- Sandri, M., Colussi, A., Perrotta, M. G., & Stefanon, B. (2015). Salivary cortisol concentration in healthy dogs is affected by size, sex, and housing context. *Journal of Veterinary Behavior: Clinical Applications and Research*, 10, 302-306.
- Santos, A. A., & Matos, A. J. (2015). Advances in the understanding of the clinically relevant genetic pathways and molecular aspects of canine mammary tumours. Part 2: invasion, angiogenesis, metastasis and therapy. *The Veterinary Journal*, 205(2), 144-153. doi: 10.1016/j.tvjl.2015.03.029
- Scott-Moncrieff, J. C. (2007). *Role of Sex Hormones in Diagnosis of Adrenal Dysfunction*. In Proceedings North American Veterinary Conference: Small animal and exotics section. Acedido em Jan. 2016 em: <http://www.ivis.org/proceedings/navc/2007/SAE/137.asp?LA=1>.

- Sephton, S. E., Sapolsky, R. M., Kraemer, H. C., & Spiegel, D. (2000). Diurnal cortisol rhythm as a predictor of breast cancer survival. *Journal of the National Cancer Institute*, 92(12), 994-1000.
- Sisson, S., Grossman, J. D., & Getty, R. (1975). Endocrinologia dos carnívoros. In *Sisson and Grossman's Anatomia dos animais domésticos* (5th ed.). (pp.1742-1745) Philadelphia: Saunders.
- Sisson, S., Grossman, J. D., & Getty, R. (1975). Neurologia dos carnívoros. In *Sisson and Grossman's Anatomia dos animais domésticos* (5th ed.). (pp.1832-1906) Philadelphia: Saunders.
- Steiss, J. E., Schaffer, C., Ahmad, H. A., & Voith, V. L. (2007). Evaluation of plasma cortisol levels and behavior in dogs wearing bark control collars. *Applied Animal Behaviour Science*, 106(1), 96-106.
- Stockham, S. L., & Scott, M. A. (2002). Adrenocortical function. In *Fundamentals of veterinary clinical pathology* (1st ed.). (pp.805-830). Ames, Iowa: Iowa State Press.
- Talbott, S. M. (2007). The relationship between stress and disease. In *The cortisol connection : why stress makes you fat and ruins your health-and what you can do about it* (2nd ed.). (pp.104-109). Alameda, CA: Hunter House.
- Teske, E. (2010). *COX-2 Therapy and cancer*. In Proceedings of the 35th World Small Animal Veterinary Congress WSAVA 2010, Geneva, Switzerland. Acedido em Fev. 2016 em: <http://www.ivis.org/proceedings/wsava/2010/b49.pdf>.
- Tomlinson, J. W., & Stewart, P. M. (2001). Cortisol metabolism and the role of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *Best Practice Research Clinical Endocrinology and Metabolism*, 15(1), 61-78. doi: 10.1053/beem.2000.0119
- Venzke, W. G. (1975) Endocrinologia geral. In Sisson, S., Grossman, J. D., & Getty, R. *Sisson & Grossman's Anatomia dos animais domésticos* (5th ed.). (pp.172-187). Philadelphia: Saunders.
- Wenger-Riggenbach, B., Boretti, F. S., Quante, S., Schellenberg, S., Reusch, C. E., & Sieber-Ruckstuhl, N. S. (2010). Salivary cortisol concentrations in healthy dogs and dogs with hypercortisolism. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 24(3), 551-556. doi: 10.1111/j.1939-1676.2010.0494.x
- Nelson, R. W., Turnwald, G. H., Willard, M. D. (2012). Endocrine, Metabolic, and Lipid Disorders. In Willard, M. D., & Tvedten, H. *Small animal clinical diagnosis by laboratory methods* (5th ed.). (pp.180-187). St. Louis, Missouri.: Elsevier.
- Xing, Y., Lerario, A. M., Rainey, W., & Hammer, G. D. (2015). Development of Adrenal Cortex Zonation. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 44(2), 243-274. doi: 10.1016/j.ecl.2015.02.001

E - ANEXOS

Anexo 1: Relatório do período de estágio na Arvivet Veterinaris

INFORME DE ALUMNO EN PRÁCTICAS DE ANA MARTA LOURINHO ROMANA

La estudiante Ana Marta Lourinho Romana ha realizado tres meses de prácticas, de 15 septiembre hasta 15 diciembre de 2014, en nuestra clínica veterinaria Arvivet Veterinaris situada en Terrassa, Barcelona.

Durante este período ha hecho actividades en las siguientes áreas y con las siguientes tareas:

.- *Laboratorio*: hemograma, bioquímicas, análisis de orina y pruebas rápidas SNAP; preparación y envío de muestras a un laboratorio externo; exámenes coprológicos, tinción de citologías, y observación al microscopio.

.- *Diagnóstico por imagen*: ayuda, desarrollo y preparación de los pacientes y aparato para realizar radiografías, ecografías, ecocardiogramas y electrocardiogramas y el estudio de los respectivos exámenes.

.- *Área quirúrgica*: ayudante de cirujano y realización como cirujana de castraciones de perro, gato y conejillos de India (mascota); Preparación de los pacientes para la cirugía. En especial ha participado en cirugías de traumatología y ortopedia, oftalmológicas y de tejidos blandos.

.- *Medicina interna*: la estudiante ha realizado exámenes físicos, y ha ayudado en la aplicación de vacunas. Ha ayudado en la elaboración de una lista de diagnósticos diferenciales y tratamientos en caso de síndrome vestibular, y resúmenes de artículos para el estudio de un caso del colapso durante el ejercicio en border collie.

.- *Área dermatología*: Ha realizado de raspados de piel, cultivos DTM, y pruebas de acetato de celulosa para la detección de parásitos. También ha participado en la discusión de casos clínicos en esta especialidad.

.- *Hospitalización*: ha aplicado en animales ingresados la medicación pautada (via subcutánea, intramuscular e intravenosa) ha sacado sangre y ha colocado vías intravenosas en animales de todos los tamaños.


.- *Área de reproducción y obstetricia*: ha practicado la resucitación y los cuidados neonatales después de varias cesáreas y ha ayudado en varias inseminaciones intrauterinas por endoscopia. También ha participado en el diagnóstico ecográfico de gestación y en la preparación de cesáreas programadas.

Josep Arús Martí, veterinario


Colegiado provincia Barcelona 2066

Diplomado por el European College for Animal Reproduction (ECAR)

Small Animal subspeciality

**ARVIVET veterinaris**

Urgències 24h. Tel. 615 165 740
Avda. Tèxtil, 42 nau E - 08223 TERRASSA (Barcelona) Tel. 93 788 94 30



Anexo 2: Descrição estatística da casuística acompanhada durante o período de estágio

Gráfico 4 – Frequência relativa das diferentes espécies

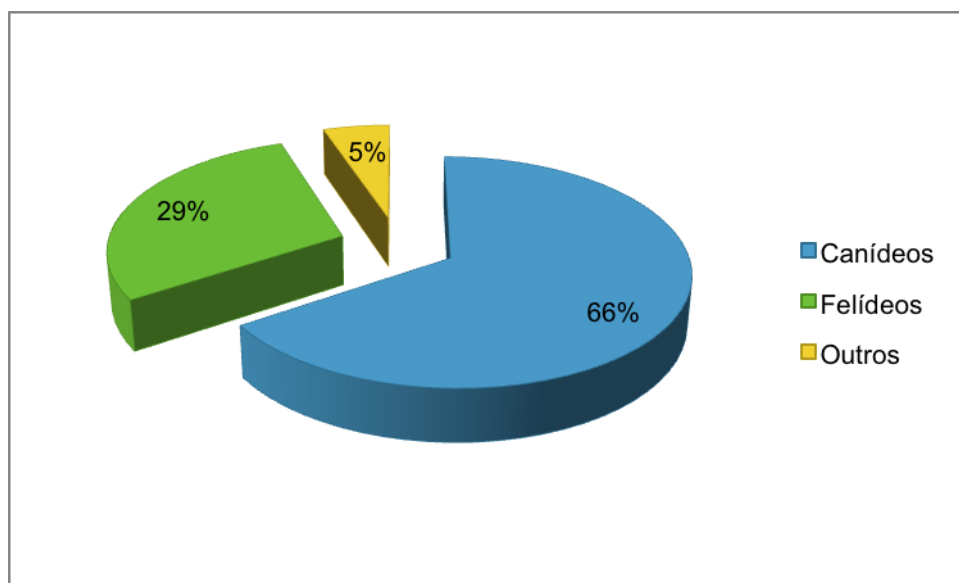


Gráfico 5 – Frequência relativa da casuística em diferentes áreas da Clínica de Pequenos Animais

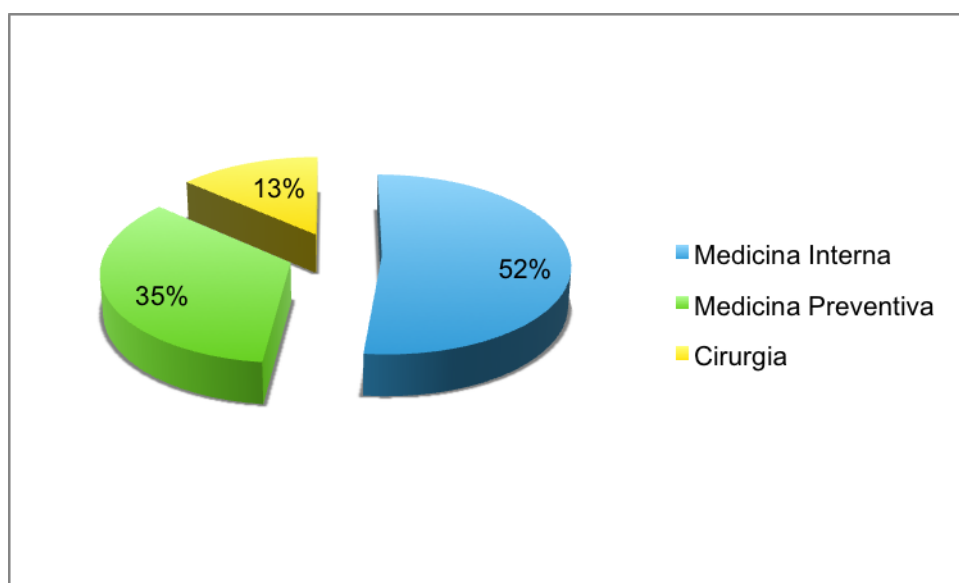


Gráfico 6 – Frequência relativa das diferentes espécies em várias áreas da Medicina Interna

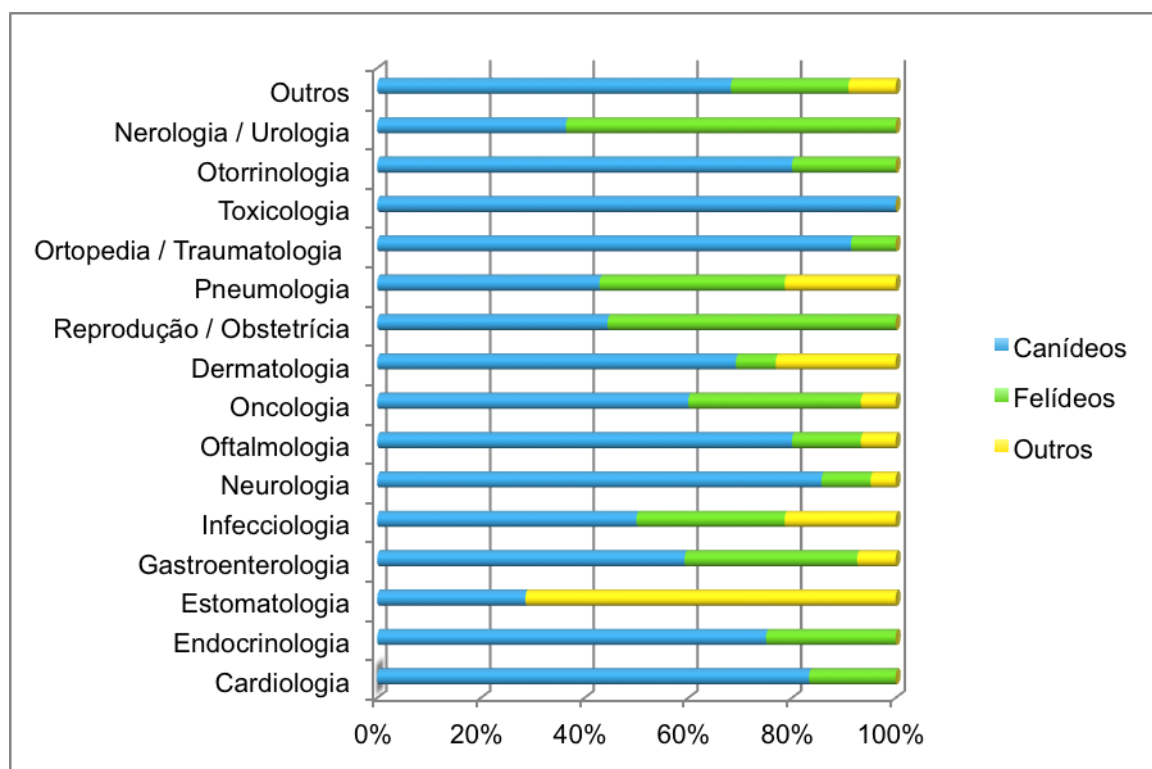


Gráfico 7 – Frequência relativa das diferentes espécies em várias áreas da Medicina Preventiva

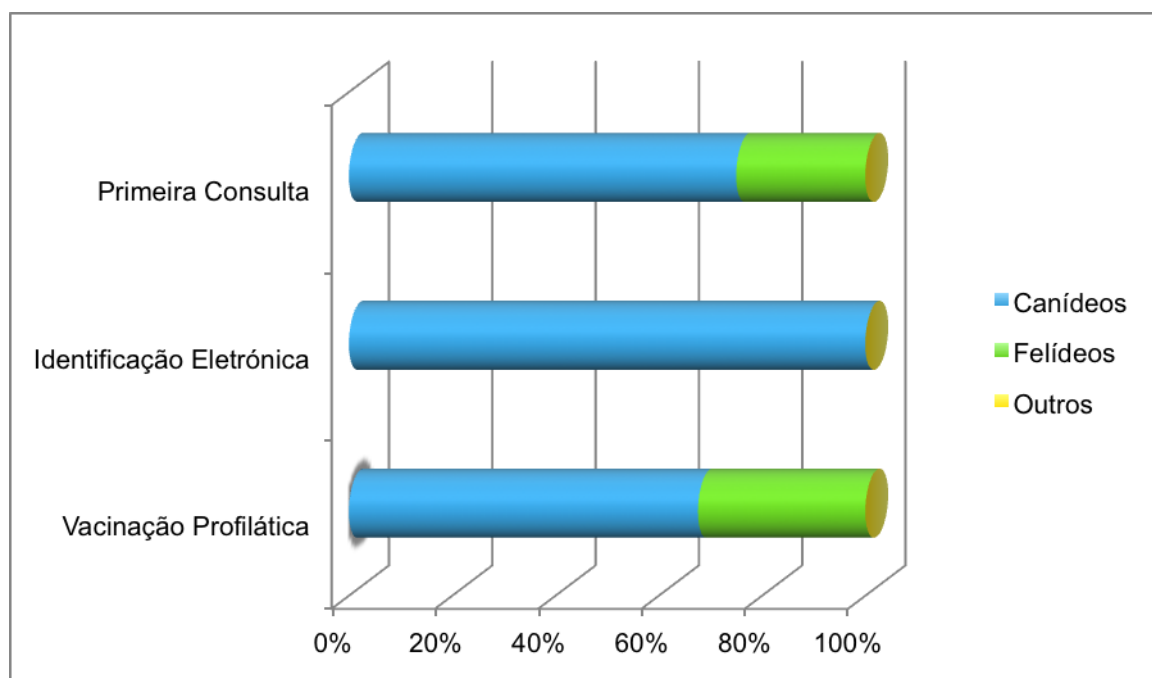


Gráfico 8 – Frequência relativa das diferentes espécies em várias áreas da Cirurgia

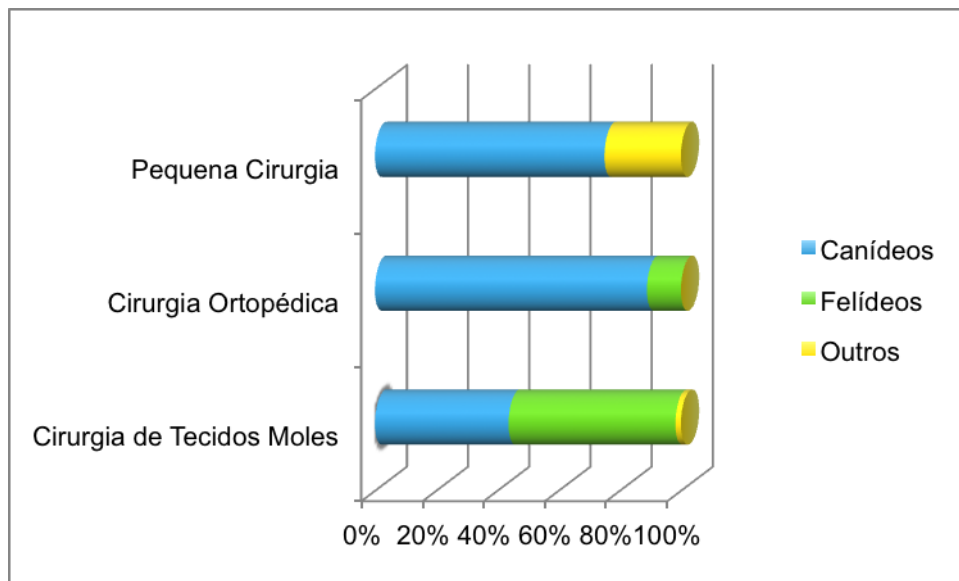
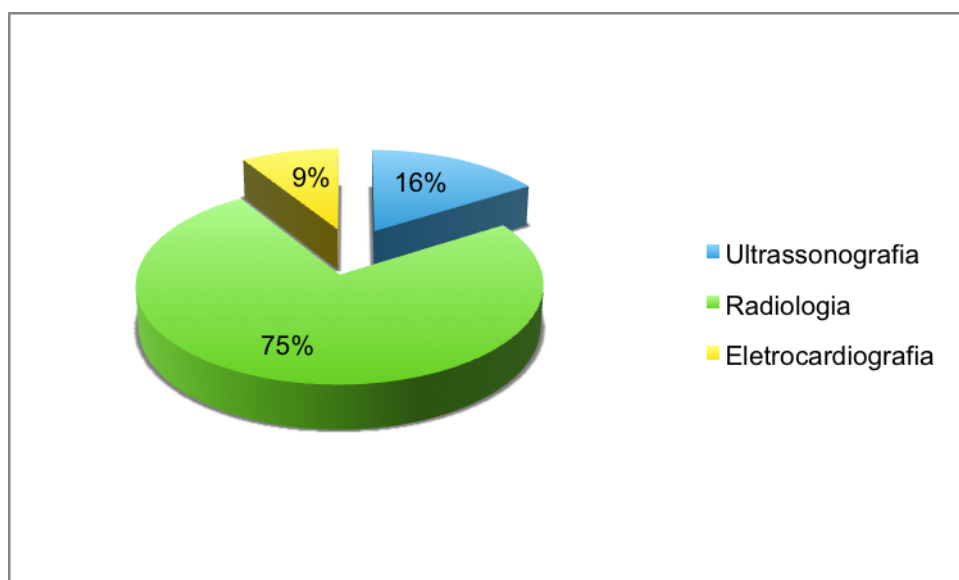


Gráfico 9 – Frequência relativa da casuística em diferentes áreas da Imagiologia



VARIAÇÃO DOS NÍVEIS DE CORTISOL COMO FACTOR DE PROGNÓSTICO NA DOENÇA ONCOLÓGICA DA MAMA – ESTUDO PRELIMINAR

Ficha Nº

Caracterização do Doente

Nome dono:			Nome doente:		
Espécie:	Canídeo	Felídeo	Idade:	Peso:	
	1 -			1 -	
Doenças de base	2-		Terapêutica concomitante	2 -	
	3 -			3 -	

Caracterização da Mama

	Direita	Esquerda	Ulceração	Dolorosa	Dimensão
Mama afetada	1 ^a				
	2 ^a				
	3 ^a				
	4 ^a				
	5 ^a				

Início da lesão da mama

Diagnóstico

Citológico

Anatomopatológico

Caracterização do Cortisol

[Cortisol] T0 (colheita no dia 1 pré-cx) T1 (colheita ao 10º dia)